

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-513565

(43)公表日 平成11年(1999)11月24日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	FI	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 31/00	6 3 5	A 6 1 K 31/00	6 3 5
48/00		48/00	
C 1 2 N 5/10		C 0 7 K 14/52	
// C 0 7 K 14/52		C 1 2 N 5/00	B
		審査請求 未請求	予備審査請求 有 (全 60 頁)

(21)出願番号 特願平9-515631
 (86)(22)出願日 平成8年(1996)10月21日
 (85)翻訳文提出日 平成10年(1998)4月20日
 (86)国際出願番号 PCT/GB96/02576
 (87)国際公開番号 WO97/14808
 (87)国際公開日 平成9年(1997)4月24日
 (31)優先権主張番号 60/005,649
 (32)優先日 1995年10月19日
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 9525906,5
 (32)優先日 1995年12月19日
 (33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 セント ジュード チルドレンズ リサーチ
 ホスピタル
 アメリカ合衆国, テネシー 38105-2794,
 メンフィス, ノース ローダーデール ス
 トリート 332
 (71)出願人 キャンタブ ファーマシューティカルズ
 リサーチ リミティド
 イギリス国, ケンブリッジ シービー4
 4 ジーエヌ, ミルトン ロード, ケンブリ
 ッジ サイエンス パーク, 184
 (74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘルペスウィルスベクター及びその利用

(57)【要約】

ヒト又は非ヒト動物細胞を処理して前記細胞に異種遺伝子材料を導入し、そして前記細胞の中で前記材料を発現するための方法であって、(a)衰弱化又は複製欠陥型であり、且つ非形質転換性突然変異ヘルペスウィルスであり、しかも異種遺伝子材料を担持する組換えヘルペスウィルスベクターを用意し、そして(b)造血細胞、血液細胞に関連する悪性細胞及び悪性又は非悪性CD34+細胞より選ばれるヒト又は非ヒト動物細胞を形質導入せしめて前記遺伝子材料を発現するためにこの細胞を前記ウィルスベクターと接触させることにより形質導入する、ことを含んで成る方法。とりわけ適用される技術は、例えば悪性細胞から腫瘍免疫原を作るための遺伝子の移入による造血細胞の改変である。

【特許請求の範囲】

1. 造血細胞、血液細胞に関連する悪性細胞及び悪性又は非悪性CD34+細胞から選ばれるヒト又は非ヒト動物細胞を形質導入するための調製品の製造における、衰弱化又は複製欠陥型であり、且つ非形質転換性突然変異ヘルペスウイルスであり、しかも異種遺伝子材料を担持する組換ヘルペスウイルスベクターの利用。

2. 前記異種遺伝子材料が腫瘍治療、免疫治療又は遺伝子治療において有用な免疫調節タンパク質又はその他の遺伝子生成物をコードする遺伝子を含んで成る、請求項1記載の利用。

3. 前記ヒト又は非ヒト動物細胞が、(形質導入前において)細胞培養条件下で全くインキュベーションされていない細胞、約2時間より長くインキュベーションされていない細胞、約4時間より長くインキュベーションされていない細胞、及び一夜ほど長くインキュベーションされていない細胞、例えばサンプリングしたばかりの細胞から選ばれる、請求項1又は2記載の利用。

4. 前記で得られる形質導入細胞を、(a)親細胞が由来する対象体への前記細胞の再導入、及び(b)in vitroでの前記細胞と白血球との反応、より選ばれる更なる段階にかける、請求項1, 2又は3記載の利用。

5. 前記ヒト又は非ヒト動物細胞をex-vivoで処理し、ここで前記形質導入が42%以上の効率で実施される、請求項1～4のいずれか1項記載の利用。

6. 前記ヒト又は非ヒト動物細胞をex-vivoで処理し、ここで前記形質導入が65%以上の効率で実施される、請求項5記載の利用。

7. 前記ヒト又は非ヒト動物細胞をex-vivoで処理し、ここで前記形質導入が80%以上の効率で実施される、請求項6記載の利用。

8. 前記ヒト又は非ヒト動物細胞をex-vivoで処理し、そして前記形質導入段階(b)を0.05～20の感染多重度(MOI)で実施する、請求項1～7のいずれか1項記載の利用。

9. 前記複製欠陥突然変異ウイルスが、そのゲノムが感染性ウイルスの生産に必須の遺伝子に関して欠陥となっており、従って前記遺伝子が欠失しており、そしてこのウイルスが正常宿主細胞に感染でき、そしてかかる細胞の中でのウイル

ス遺伝子の複製及び発現に委ねられるが、感染性ウィルスを産生することのできない突然変異ウィルスである、請求項1～8のいずれか1項記載の利用。

10. 感染性ウィルスの産生に必須である前記遺伝子が欠失しており、そして異種タンパク質をコードする前記遺伝子が前記突然変異ウィルスのゲノムの前記欠失した必須遺伝子の座において挿入されている、請求項9の利用。

11. 前記ウィルスベクターがHSVの突然変異体である、請求項1～10のいずれか1項記載の利用。

12. ヒト又は非ヒト動物起源の造血細胞、血液細胞に関連する悪性細胞及び悪性又は非悪性CD34+細胞から選ばれるヒト又は非ヒト動物細胞に異種遺伝子を導入してその細胞をより高度に免疫原性とするための、前記細胞の形質導入のための調製品の製造における、衰弱化又は複製欠陥型であり、且つ非形質転換性突然変異ウィルスベクターであり、しかもサイトカイン並びに免疫学的補助刺激分子及び化学誘引物質から選ばれる免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を含んで成る異種遺伝子材料を担持する組換えヘルペスウィルスベクターの、請求項1～11のいずれか1項記載の利用。

13. 前記ウィルスベクターが、サイトカイン、免疫学的補助刺激分子及び免疫学的化学誘引物質より選ばれる異種免疫調節タンパク質をコードする遺伝子をコードする、請求項1～12のいずれか1項

記載の利用。

14. 前記細胞を形質導入するのに用いるウィルスベクターがGM-CSF, IL2, IL12, CD40L, B7.1 及びリンホタクチンより選ばれるサイトカインをコードするベクターである、請求項13記載の利用。

15. 請求項1～14のいずれか1項記載の方法により形質導入された細胞の、細胞障害性T細胞をこの形質導入細胞に曝露することによりかかるT細胞を活性化及び／又は増殖させるための、利用。

16. 前記形質導入細胞が悪性細胞及び／又はCD34+細胞である、請求項15記載の利用。

17. 造血細胞、血液細胞に関連する悪性細胞及び悪性又は非悪性CD34+細胞か

ら選ばれるヒト又は非ヒト動物細胞を形質導入するのに利用するための薬理組成物であって、衰弱化又は複製欠陥型であり、且つ非形質転換性突然変異ヘルペスウイルスであり、しかも異種遺伝子材料、例えば異種タンパク質をコードする遺伝子を担持する組換えヘルペスウイルスベクターを含んで成る、組成物。

18. 造血細胞、血液細胞に関連する悪性細胞及び悪性又は非悪性CD34+細胞から選ばれるヒト又は非ヒト動物細胞を含んで成る薬理組成物であって、前記細胞が衰弱化又は複製欠陥型であり、且つ非形質転換性突然変異ヘルペスウイルスであり、しかも異種遺伝子材料、例えば異種タンパク質をコードする遺伝子を担持する組換えヘルペスウイルスベクターにより感染されている、組成物。

19. *in vivo* での外来遺伝子の発現を達成するための、ヒト又は非ヒト動物被検体である被検体を処置するのに利用するための医薬品の製造における請求項17又は18記載の組成物の利用。

20. 免疫応答を誘導するための、ヒト又は非ヒト動物被検体である被検体を処置するのに利用するための医薬品の製造における請求項18記載の組成物の利用。

【発明の詳細な説明】

ヘルペスウィルスベクター及びその利用

発明の分野

本発明はウィルスベクター及びその利用のための方法、特に、例えば細胞、例えば造血細胞系の悪性細胞を形質転換する及びかかる細胞における外来性遺伝子材料の発現と誘導するための方法に関する。本発明は更にかかるウィルスベクターを基礎とする薬理組成物、かかるウィルスベクターにより感染した細胞の製造、かかる細胞を基礎とする薬理調製品、*in vivo* で外来遺伝子材料を発現させるためのヒト及び非ヒト動物への投与のためのその利用、並びに本明細書に記載の通りの処置及びその他の用途のための調製品の製造のための本明細書に記載の材料の利用にも関連する。本発明に係る方法は例えば癌の免疫療法に利用できうる。

発明の背景

組換ウィルスベクターは、いくつかの公知の因子の中でも、外来遺伝子をタンパク質として発現されうるように細胞に導入するのに有用なものである。中心要素は形質転換する細胞の中で機能しうる適当なプロモーター配列のコントロール下にある標的遺伝子自体である。既知の技術には非ウィルスの方法、例えば遊離DNAとしての標的遺伝子構築体の単なる添加；標的DNAと標的細胞へのDNAの取込みのためにデザインされた特異的なタンパク質との複合体とのインキュベーション；並びにリポソーム又はその他の脂質を基礎とする感染因子の中に封入された標的DNAとのインキュベーションが含まれる。

更なるオプションは、必須の標的遺伝子を含むように操作され、且つ標的細胞に感染でき、それ故細胞の中に標的遺伝子を発現できる状態で運び込む組換ウィルスベクターの利用である。多種多様なウィルス、例えばレトロウィルス、アデノウィルス及びアデノ関連ウィルスがこの目的のために利用されている。

明細書EP 0,176,170号 (Institut Merieux ; B Roizman) には、ゲノムのプロモーター調節領域のコントロール下で単純ヘルペスウィルスゲノムの中に挿入され、それ故外来遺伝子の発現のためのベクターを担う外来遺伝子が記載されてい

る。DNA 構築体、外来遺伝子の発現のために有用な構築体を含むプラスミドベクター、このベクターにより製造された組換えウイルス、及び関連の方法が開示されている。

明細書EP 0,448,650号 (General Hospital Corporation : A I Galler, X O B reakefield) には非有系分裂細胞に感染でき、その中で繁殖することができ、そして神経障害の処置において利用するための、並びにかかる障害の動物及びin vitroモデルを作り上げるためのI型単純ヘルペスウイルス発現ベクターが記載されている。

組換えウイルスは遺伝子欠損症に適用される (例えば修復) 遺伝子治療に特に有用であることで知られている。

修復遺伝子治療において利用されている又は提案されている遺伝子の例えば : 例えばWO92/10564 (KW Culver ら : US Secretary for Commerce & Cellico Inc) 並びにWO89/12109及びEP 0420911 (I H Pastanら) に記載のヒトアデノシンデアミナーゼ(ADA)についての遺伝子 ; WO91/02796(L-C Tsuiら : HSC Research & University of Michigan)、WO92/05273(F S Collins & J M Wilson ; University of Michigan)及びWO94/12649 (R J Gregory ら : Genzyme Corp.) に記載の嚢胞性線維症が含まれる。

悪性腫瘍処置の従来技術は患者自身の腫瘍に由来する自己物質を利用する腫瘍に対する治療用ワクチン化についての潜在能力をハイライトとする研究を含む。この手法の背景にある一般的な理論は、腫瘍細胞が正常な健康細胞から区別され、そしてそれ故腫瘍細胞を認識して破壊する免疫応答を狙いとするのに利用され得る。1もしくは複数種のタンパク質又はその他の生物学的巨大分子を発現しうることにある。

このような腫瘍標的は一定のタイプの腫瘍の中に遍在的に存在しうる。この良い例は頸部癌であり、それにおいては腫瘍の大多数がヒトパピロマウイルスE6及びE7タンパク質を発現する。この場合、腫瘍標的は自己タンパク質ではなく、それ故癌免疫治療のための固有腫瘍特異的マーカーとしてのその潜在能力は明確である。

一定の自己タンパク質が腫瘍標的抗原としても利用できるという証拠が増えつつある。これはそれらが正常な健康細胞ではなく、腫瘍細胞において一貫して発現されるという所見に基づく。このような例にはMAGE科のタンパク質が含まれる。腫瘍標的として有用なもっと多くの自己タンパク質が同定されないままであるものと予測される。

腫瘍関連抗原及び一定の癌の免疫生物学におけるその役割は例えばP van der Bruggen ら、Current Opinion in Immunology 4(5) (1992) 608-612に記載されている。MAGEシリーズのその他のかかる抗原がT. Boon, Adv Cancer Res 58 (1992) pp 177-210において同定され、そしてその他の近縁腫瘍抗原がP. van der Bruggenら、Science 254 (1991) 1643-1647において同定されている；腫瘍関連ムチンはPO Livingston のCurrent Opinion in Immunology 4(5) (1992) pp 624-629 に記載されている；例えば MUC 1 はJ. Burchall らInt J Cancer 44 (1989) pp 691-696 に記載されている。

いくつかの潜在的に有用な腫瘍特異的マーカーが同定及び特性決定されているが、新たな、そしておそらくはより特異的なマーカーについての探索はめんどろであり、且つ時間がかかる。

実験上の頭蓋内マウス黒色腫が神経衰弱 HSV 1 突然変異体1716により処置されたことが記載されており(BP Randazzo ら、Virology 211 (1995) pp 94-101)、それにおいてはこの突然変異体の複製は腫瘍細胞に制約され、そして周囲の脳組織では起こらなかった。

サイトカインをそのまま（即ちタンパク質として）哺乳動物に投与することが試みられているが、往々にして宿主によりあまり寛容されず、そしてしばしば悪心、骨痛及び発熱等を含む一定の副作用が伴う。(A Mire-Sluis, TIB Tech vol 11 (1993) ; MS Moore のAnn Rev Immunol 9 (1991) 159-91)。これらの問題は有効な血漿濃度を保つのに往々にして必要とされる用量レベルにより一層悪化する。

生きたウィルスベクターをサイトカン又は腫瘍抗原をコードする遺伝子を含むように改変することが公知である。ウィルスベクターを、腫瘍免疫反応性を高め

るための手段を司るように癌免疫治療において利用することが提案されている。明細書W086/07610号 (Transgene : MP Kienyら) はヒトIL-2タンパク質をコードするDNA配列全体又は一部を含んで成る組換ボックスウイルスによる哺乳動物細胞におけるヒトIL-2の発現を開示している。明細書EP 0259212号 (Transgene SA : R Latheら) は少なくとも腫瘍特異的タンパク質の必須領域をコードする異種DNA配列を含む、腫瘍をコントロールするためのボックス、アデノ又はヘルペス型のウィルスベクターを開示する。明細書W088/00971 (CSIRO, Australian National University : Ramshaw ら) は、抗原性ポリペプチドの少なくとも一部を発現するヌクレオチド配列と、リンホカイン (インターロイキン

1, 2, 3もしくは4、又はガンマーインターフェロン) の少なくとも一部を発現する第二配列とを含むボックス、ヘルペス又はアデノウィルスワクチンベクター、特にワクシニアを含んで成る組換ワクチンを開示する。これは抗原性ポリペプチドに対する免疫反応を高める。明細書W094/16716号 (E Paolettiら : Virogenetics Corp.) には、例えば癌治療において利用するためのサイトカイン又は腫瘍抗原をコードするDNAを含む衰弱組換ワクシニアウィルスが記載されている。

GM-CSF 形質導入腫瘍細胞が腎癌に対する治療用ワクチンとして利用できることが提唱されている。対応の試験のためのプロトコールは、患者からの腫瘍物質を取り出し、そしてその後適当な免疫調節遺伝子により形質導入することを包括する。操作した細胞を患者に再導入して有利な免疫反応を刺激する。

非ヒト霊長類のウィルスであるヘルペスウィルスサイミリ (saimiri) を基礎とするベクターはヒトリンパ系細胞における遺伝子発現を導くことが記載されている (B Fleckenstein & R Grassmann, Gene 102(2) (1991) pp 265-9)。しかしながら、臨床的な状況でかかるベクターを利用するのは望ましくないものと考えられている。

一定の種類の腫瘍細胞の如き細胞への免疫調節及びその他の遺伝子の導入が知られているが、これを達成する現存の方法は本発明者により制約を有するものと考えられ、その困難性は形質導入の定量的な低さ、複雑さ、又は利用する系の所望されない副作用に基づく。

本発明者は今日まで、いくつかの種類の細胞、例えば造血細胞系、例えば白血病への遺伝子の導入は困難であると、又は例えば修復遺伝子治療もしくは癌免疫治療の目的のために効率よくそれを実施するのは困難であると考えた。

造血先祖細胞の如き細胞への遺伝子の移入のため、今日までレトロウィルスベクターが最も広く試みられたベクターである。しかしながらこれらのベクターは分裂していない細胞の中には組込まれず、且つ発現されないことが明らかであり、そしてこのことは例えば遺伝子移入及び発現のための標的として造血幹細胞(HSC)又はヒト造血悪性腫瘍由来の一次細胞の如きと一緒に利用したときのその価値を制約してしまう。この制約を解消するため、標的細胞、例えばHSCと造血増殖因子、例えばサイトカインとの培養が、HSCを細胞サイクルへと誘導する及びこのような標的細胞へのレトロウィルス媒介遺伝子移入の効率性を高める観点で試みられているが、残念ながら培養培地の中のサイトカインは細胞の所望される自己再生能力の損失を伴って分化を誘導することが認められている。

そこで、レトロウィルスベクターの代わりにアデノ関連ウィルスベクターの利用が提案されているが、かかるベクターの組込み効率は低いことが認められている。

また、本発明者は、アデノウィルスベクターによる近年の経験に基づき、これらが制約を有するものと考えている。即ち、それらは一定の条件下で造血細胞の約50%に感染できうるが、にもかかわらず、遺伝子発現は往々にして数日遅れる。一定の試験において、組換えアデノウィルスベクター又はレトロウィルスベクターによる急性白血病細胞への異種遺伝子の形質導入がごくわずかである又はあったとしても約3%の形質導入収率しか供さないことも見い出され、それ故かかるベクターによる形質導入収率の効率には問題がある。

本発明：

本発明者は、従来技術が、更なるウィルスベクター並びにヒト及び動物細胞を形質転換するうえでのその利用のための方法の提供の所望をいまだ残しているものとする。特に、有用な迅速性をもつ

てヒト及び非ヒト動物細胞に対する遺伝子移入を供する材料及び方法の提供の所望が残っている。また、有用な効率をもって遺伝子移入を供する材料及び方法の提供を所望される。更に、有用な一連の標的細胞タイプ、例えば非分裂性細胞に適用できる遺伝子移入のための材料及び方法の提供が所望される。

本明細書に記載の本発明の観点に従い、ヘルペスウィルスベクターによる形質導入のための標的細胞は、造血細胞系の細胞；リンパ系又は骨髄系細胞由来の細胞；幹細胞又はCD34+細胞由来の細胞、例えば骨髄移植との関連で得られた又は調製された細胞の如きを含む細胞調製品由来の細胞；又は神経外胚葉起源の細胞、特にかかる悪性細胞、及び本明細書記載のウィルスベクターの形質導入された細胞から選ばれうる。この用途において、本発明の例示に従う一定の方法及び手順は驚くべきほどに高い形質導入効率を供しうることが見い出された。

一の観点において、本発明は免疫原及びワクチンとしての腫瘍細胞の利用を促進する材料及び方法の提供を担いとする。更なる観点において、本発明は造血細胞系の細胞の形質導入を促進し、且つそれに基づく有用な組成物及び手順を提供することを担いとする。

本発明はまた例えば現存の腫瘍における腫瘍特異的抗原に対する免疫応答を誘導するために利用できる免疫原及び治療用ワクチンを作り上げるための手段の提供を担いとする。

本発明は特に、単純ヘルペスウィルスの如きヘルペスウィルスの後期溶解遺伝子の発現を許容しない造血細胞、例えばリンパ細胞への遺伝子移入の如きに利用できる。

本発明の観点に従うと、異種遺伝子材料、例えば異種遺伝子を含んで成る材料をヒト又は非ヒト動物細胞に導入するため、例えば前記遺伝子材料を前記細胞の中で発現させるために前記細胞を処理す

る方法であって、(a) 衰弱化又は複製欠陥型であり且つ非形質転換性である突然変異ヘルペスウィルスであり、そして異種タンパク質をコードする遺伝子の如きの異種遺伝子材料を担持する組換えヘルペスウィルスベクターを用意し、そして
(b) 造血細胞、血液細胞に関連する悪性細胞、及び悪性又は非悪性CD34+細胞

より選ばれるヒト又は非ヒト動物細胞を、これらの細胞を前記ウィルスベクターと接触させて前記細胞を形質導入させることにより形質導入する段階を含んで成る方法を提供する。下記の本発明の態様において、前記遺伝子材料を前記細胞内で発現させる。形質導入は公知の方法でのウィルスベクターによる生きた標的細胞の感染により行われる。

かかる方法は、例えば異種遺伝子材料をヒト又は非ヒト動物細胞に導入して前記細胞を一層高度な免疫原性にするような前記細胞の処理であって、(a) 衰弱化又は複製欠陥型であり且つ非形質転換性である突然変異ヘルペスウィルスであり、そしてサイトカイン及び免疫学的同時刺激性分子及び化学誘引物質より選ばれる異種免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を担持する組換ヘルペスウィルスベクターを用意し、そして(b) 血液細胞に関連する悪性細胞、造血細胞、悪性又は非悪性CD34+細胞より選ばれる悪性又は非悪性ヒト又は非ヒト動物細胞をこれらの細胞を前記ウィルスベクターと接触させて前記細胞を形質導入させることにより形質導入する段階を含んで成る処理を含んで成りうる。

ヒト又は非ヒト動物細胞の形質導入において利用するための本発明の所定の態様に従って提供及び利用される薬理調製品は造血細胞；血液細胞に関連する悪性細胞；及び悪性又は非悪性CD34+細胞より選ばれることができ；衰弱化又は複製欠陥型であり且つ非形質転換性である突然変異ヘルペスウィルスであり、そして異種タンパク質をコードする遺伝子の如き異種遺伝子材料を担持する組換ヘルペスウィルスベクターを含んで成りうる。

本発明の所定の態様に従って提供及び利用される薬理調製品は造血細胞；血液細胞に関連する悪性細胞；及び悪性又は非悪性CD34+細胞より選ばれるヒト又は非ヒト動物細胞を含んで成り；前記細胞は衰弱化又は複製欠陥型であり、且つ非形質転換性である突然変異ヘルペスウィルスであり、そして異種タンパク質をコードする遺伝子の如きを担持する組換ヘルペスウィルスベクターで感染されている。

更に本発明に属するのは、in vivo での外来遺伝子の発現を達成するためのヒト被検体又は非ヒト動物被検体である被検体を処置する方法であって、前記被検

体に本明細書記載の上記の種類の薬理組成物を投与することを含んで成る方法；及び免疫応答を誘引するためのヒト被検体又は非ヒト動物被検体である被検体を処置する方法であって、前記被検体に本明細書記載の上記の種類の薬理組成物を投与することを含んで成る方法である。

本発明の観点は、例えば非形質転換性ヘルペスウィルスを基礎とし、タンパク質、例えば免疫調節タンパク質又は遺伝子治療との関連で発現が有用であるタンパク質をコードする組換ヘルペスウィルスベクターの提供及び利用を考慮する；更に本発明により提供されるのは細胞を一層高度に免疫原性とするためのその形質導入におけるかかるベクターの利用である：このようにして有用に処理できる細胞はとりわけ、例えばヒト及び非ヒト動物の悪性細胞、特に、例えば血液細胞に関連する悪性細胞、例えば白血病細胞又は造血細胞、例えば悪性であろうとなかろうともCD34+細胞である。即ち、処理のために適当な細胞には、例えば造血先祖細胞、例えば健康なCD34+細胞であって、処理細胞の中で発現するのが所望される異種遺伝子を担持するヘルペスウィルスベクターにより形質導入されると

、高いコピー数の異種遺伝子を担持することができ、インテグラーゼを要せずに処理細胞のゲノムと相同組換できる細胞が含まれる。

とりわけ本発明の態様の用途は、腫瘍免疫原を作成するための遺伝子の移入による悪性造血細胞の改変である。腫瘍免疫原として機能する改変細胞の中で有用に作成される物質はとりわけGM-CSF及びインターロイキン2である。例えば、腫瘍細胞によるインターロイキン2の産生は抗腫瘍応答の発生におけるTヘルパー機能（E R Fearonら、Cell 60 (1990) pp 397 以降）を迂回することが報告され、そしてマウスGM-CSFの場合（G Dranoff ら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90 (1993) pp 3539 以降）、GM-CSFを分泌するように操作された照射済腫瘍細胞によるワクチン化が潜在的で特異的な持続性抗腫瘍免疫性を刺激することが報告されている。

かくして、本発明の態様に従うと、組換ヘルペスウィルス、例えば組換HSV が（例えば白血病細胞の形質導入のためのベクターとして利用でき、これによりかかる細胞において免疫調節タンパク質又は癌免疫治療もしくは遺伝子治療に関連

するその他のタンパク質をコードする遺伝子の如き挿入遺伝子材料の発現を供される。本発明の詳しい例において、HSV1又はHSV2の組換単純ヘルペスウイルスであって、そのゲノムの一部として異種遺伝子を含むように操作されたものは、白血病細胞に良好な効率をもって遺伝子を搬入するのに、腫瘍細胞内での異種遺伝子の効率的な発現を誘起するのに利用でき、そして形質導入細胞は例えば細胞性免疫原、例えば癌免疫治療のためのワクチンとして利用でき、それ故様々な効果のうちとりわけ、ウィルスベクターで感染された細胞以外の腫瘍細胞に対する免疫効果を媒介できる。かくして、本発明はとりわけ白血病細胞の遺伝子形質導入のために有用な方法も提供する。

更に本発明の一定の態様に従って提供するのは、組換ヘルペスウ

イルス、例えばHSV、例えば複製欠陥型ヘルペスウイルス、例えばHSV1又はHSV2の複製欠陥型HSVの、造血細胞系及びその他の細胞タイプの細胞を基礎とするタイプの様々な細胞、例えば神経芽腫の形質導入のための、例えばかかる細胞に免疫調節遺伝子、又は遺伝子治療もしくは癌免疫治療の目的のためのその他の遺伝子の導入のための利用の方法である。

HSVを基礎とする組換ベクターの例を利用する白血病細胞への形質導入は新鮮な腫瘍細胞を利用して効果的に達成できうることも見い出された。かくして、細胞培養条件下で全くインキュベーションされていない、又はあまり長い時間インキュベーションされていない（例えば約2～4時間以内、又は一夜の如くインキュベーションしていない）細胞（形質導入まで）、例えば採取したばかりの腫瘍細胞を、適当な遺伝子細胞を担持する本明細書に記載の組換ヘルペスウイルスベクターに曝露してよい。これは腫瘍細胞により発現されない、又は実質的に発現されない遺伝子材料、例えばGM-CSFの如き免疫調節タンパク質をコードする遺伝子材料であってよく、これにより細胞は組換ヘルペスウイルスベクターにより感染され、そして得られる感染細胞は例えば親細胞の由来する被検体への再導入又はin vitroでの白血病細胞との反応のために利用されうる。

例えば、採取したばかりのヒト白血病細胞をヒトGM-CSF、又はとりわけ本明細書記載のその他の免疫調節タンパク質のいずれかをコードする遺伝子を担持する

ウィルスベクターに曝露させ、そして免疫原性細胞調製品として被検体に、例えば下記の手順の一部又は全てを利用し、細胞の有用な形質導入度をもって再導入できる。対して、従来、対応のレトロウィルスベクターの利用では、通常、例えば細胞を細胞分裂へと誘導してレトロウィルス形質導入され易くするため、形質導入する前に腫瘍細胞をin vitroで数日間培養する必

要があったことが証明されている。

これは本明細書に記載の組換ヘルペスウィルスベクターの有用な利点であり、なぜならそれは腫瘍細胞の研究室操作についてのニーズを少なくし、より迅速であり、より効率的な細胞形質導入率であり、そして一層有用な臨床的処置の選択を担いうるからである。

細胞障害性T細胞は例えばin vitroで、例えば癌免疫治療の目的のため、ウィルス形質導入提示細胞又は標的細胞、例えば特に造血細胞系の標的細胞、CD34+細胞の利用により活性化及び／又は増幅でき、ここで形質導入のために用いるウィルスは所望の治療に関連する抗原、例えばEBV 又はHPV によりコードされる抗原をコードし、そして更に、必要なら、本明細書に記載の免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を担持している。かかる用途の例は、腫瘍細胞がEBV 又はHPV 抗原を発現する移植被検体におけるドナー細胞腫瘍のケースである；ドナーTーリンパ球は、例えば上記したタイプの、対応の異種遺伝子、例えばHPV E 6 又はE 7 遺伝子を担持する本明細書記載のウィルスベクターによる形質導入の結果としてEBV 又はHPV 抗原を発現する標的細胞に関連して活性化及び増幅できうる。本明細書に記載の組換ヘルペスウィルスはその他の腫瘍細胞タイプ、例えば神経芽腫細胞を良好な効率をもって形質導入せしめることもできうる。

本発明に係るベクターとして利用される組換ヘルペスウィルスは免疫調節タンパク質、又は癌免疫治療もしくは遺伝子治療に関連するその他のタンパク質をコードする遺伝子を含みうる。

任意のいくつかの免疫調節タンパク質をコードする遺伝子はヒト及び非ヒト動物において腫瘍細胞を免疫原性にするのに利用できうる。得られる免疫応答は腫瘍増殖の予防及び処置において利用できうる。

免疫調節因子は免疫応答を高める又は抑制することができる分子である。これにはサイトカイン（免疫系細胞の活性化、増殖及び分化を開始又は高める可溶性糖タンパク質）、補ー刺激性分子（免疫応答を刺激するのを助けるために免疫細胞と相互作用する身体内の細胞の表層上に存在する構造）、及び免疫細胞を免疫又は炎症活性部位、例えば抗原の存在しうる部位へと誘導するのを司る（免疫学的）化学ー誘引分子が含まれる。

本明細書において言及する「免疫調節性」又は「免疫調節」タンパク質には、宿主細胞の、例えば突然変異ウイルスに対する、又はウイルスにとって外性的な病原又は起源に由来する免疫原の如き抗原に対する、又は突然変異ウイルスにより産生されるが如き腫瘍関連抗原に対する免疫反応を高めることのできる1又は複数種のタンパク質が含まれる。免疫調節性タンパク質はそれ自体が免疫原として現在利用されているものではない。

本明細書に記載のウイルスにより発現可能式に担持されたヌクレオチド配列によりコードされる免疫調節性タンパク質は、例えば組換ウイルスによるワクチンを受ける種にとって天然の配列、又は組換ウイルスにより形質導入された細胞を受容する種にとって天然の配列を有し得る。例えばヒト免疫原又はワクチンとして利用すべき、又はヒトに関連して利用すべき細胞調製品を形質導入するための実体的なヒト配列の免疫調節性タンパク質を利用することが推奨される。

完全複製ウイルスにおけるかかるタンパク質の発現に関連する任意の危険性は、ウイルスが複製欠陥突然変異体の場合、失われている。一定の態様において、これらのタンパク質は、利用される背景における免疫原又はワクチンとしての突然変異ウイルスの効果を高めるように選択されうる。

有用な免疫調節性タンパク質の例には、サイトカイン、例えばインターロイキン1～15（IL1～IL15）、アルファー、ベーター又はガンマーインターフェロン、腫瘍壊死因子（TNF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、ケモカイン、例えば好中球活性化性タンパク質（NAP）、マクロファージ化学誘引物質及び活性化性因子（MCAF）、RANTES、マクロファージ炎症性ペプチド MIP-1a

及び MIP-1b、補体成分及びそのレセプター、アクセサリー分子、例えばT細胞補助刺激因子のB7科のいずれか、例えばB7.1又はB7.2, ICAM-1, 2又は3, OX40リガンド及びサイトカインレセプターが含まれる。複数の免疫調節性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を挿入した場合、それらは複数のサイトカインを含んで成ってよく、又はサイトカインとアクセサリー分子との組合せであってよい。数多くの更なる種類の免疫調節性タンパク質及び遺伝子が本発明において有用でありうる。

極めて有用な免疫調節タンパク質の例にはGM-CSF ; IL2, IL4 ; IL7 ; IL12 ; B7.1 ; アルファ-TNF ; ガンマインターフェロン ; CD40L ; 及びリンホタキチンである。

免疫調節タンパク質をコードする遺伝子材料は突然変異ウィルスゲノム内で、別の相同的な及び任意的に別の機能を有するポリペプチド領域に連結された免疫調節タンパク質との相同性及びその機能を有するポリペプチド領域を含んで成るハイブリッド又は融合タンパク質をコードする発現可能なオープンリーディングフレームとして担持されうる。例えば、免疫調節タンパク質はヒトOX-40の結合パートナーとして同定されているgp34タンパク質である、それを含んで成る、又は機能的に対応しうる (W Goodfreyら、J Exp Med 180(2)1994 pp 757-762 及びその中の引用文献、例えばS Miura ら、

Mol Cell Biol 11(3)1991, pp 1313-1325を参照のこと)。突然変異ウィルスゲノム内でコードされうるこのバージョンのタンパク質機能は天然gp34配列自体は対応しうるか、又はそのフラグメントに対応するか、又は例えば別のタンパク質に融合したgp34の(C末端)細胞外(結合性)ドメインを基礎とするハイブリッド発現生成物、例えばgp34細胞外ドメイン(2型膜タンパク質)のN末端がイムノグロブリン定常ドメインのC末端に融合したヒト IgG1の如きイムノグロブリン重鎖の定常領域に対応しうる。

免疫調節タンパク質以外も、対応の又はその他の誘導体及びハイブリッド形態で担持及び発現されうる。かかる免疫調節タンパク質のアミノ酸配列の突然変異を組込んでよいことも理解される。ここに含まれるのは例えば配列、機能及び抗原

性特性において対応の親配列を有するタンパク質との相同性を保つような突然変異配列を有するタンパク質が含まれる。かかる突然変異は好ましくは例えば保存アミノ酸変化、例えば広い意味で類似の分子特性のアミノ酸間での変化を包括する突然変異でありうる。例えば、脂肪族群、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン内での交換が保存性と考えられうる。時折り、グリシンとこれらのいずれかとの置換も保存性と考えられうる。脂肪族群アスパラギン酸及びグルタミン酸内での交換も保存性と考えられうる。アミド群、アスパラギン及びグルタミン内での交換も保存性と考えられうる。ヒドロキシ群、セリン及びスレオニン内での交換も保存性と考えられうる。芳香族群、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン内での交換も保存性と考えられうる。塩基性群、リジン、アルギニン及びヒスチジン内での交換も保存性と考えられうる。硫黄含有群、メチオニン及びシステイン内での交換も保存性と考えられうる。時折り、メチオニン及びロイシンの群内での置換も保存性と考えられうる。好適な保

存性置換群はアスパラギン酸－グルタミン酸；アスパラギン－グルタミン；バリン－ロイシン－イソロイシン；アラニン－バリン；フェニルアラニン－チロシン；及びリジン－アルギニンである。別の観点において、突然変異配列は挿入及び／又は欠失を含んで成りうる。

誘導体及びハイブリッド形態の極めて有用な例には、トランスメンブランセグメント、細胞内配列部分、N末端又はC末端配列、例えば1～5個のアミノ酸上流の配列のいずれかの欠損した配列、並びに／又はN末端又はC末端配列、例えば1～5個のアミノ酸上流の配列の付加された配列、又は例えば上記の更なる機能性配列の付加された配列を有するタンパク質が含まれる。

適切には、免疫調節性タンパク質はサイトカイン、例えば顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を含んで成りうる。マウスGM-CSF遺伝子は、例えば141個のアミノ酸のポリペプチド、即ち、グリコシル化度に依存して14k～30kダルトンの分子量を有する成熟分泌糖タンパク質をコードする。GM-CSFは造血増殖因子科の構成員であり、そしてそれは造血先視細胞においてin vitroコロニー形成を刺激するその能力によりはじめて決定及び同定されたものである。GM-C

SFは好中球、好塩球及びマクロファージ単球機能の有能なアクベーターであり、移動性、食作用、主要組織適合性複合体(MHC)発現を高め、そして免疫系を更に刺激する生物活性分子のカスケードを開始させる。ヒトGM-CSFは化学治療後の好中球減少症の処置のため及び癌治療における補助薬として臨床業界において現在評価されている。採用する異種ヌクレオチド配列は異種遺伝子、遺伝子フラグメント又は遺伝子の組合せを含んで成りうる。

本発明はまた修復遺伝子治療に利用でき、標的細胞の有用性又は活性を高めることもできる。例えば、正常CD34+細胞をDNA修復酵

素、例えばO6-メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)をコードする本明細書記載のウィルスベクターで形質導入して、例えばニトロソウレアによる化学治療の際に(T Moritzら、Cancer Res 55(12) (1995) pp 2608-2614; R Mazeら、Proc Natl Acad Sci USA 93(1)1996 206-210参照);又は放射線損傷に対して標的細胞を保護することができる。上記の種類の修復遺伝子治療のその他の遺伝子も標的細胞に導入することもできる。

異種DNA、例えば更なるDNAを、その他の目的のためのウィルスベクターに、例えば宿主ゲノムの中にウィルスベクターDNAを組み込むのに働くことができることで知られ、宿主細胞の有系分裂が起きたときにベクターDNAが増幅し始めるようにするインテグラーゼを発現的にコードさせる;及びその他の目的のため、有効に導入してよい。

更に、本発明の態様に従うと、悪性芽細胞を破壊又は調節する修復又は致死遺伝子材料を挿入する材料及び方法を提供する。これは例えば、当該ベクターによりコードされる遺伝子材料に対応するアセンチセンス又はリボザイム配列の、本明細書記載のヘルペスウィルスベクター法による標的細胞内での発現により行われうる;例えばD Marcolaら、「Antisense Approaches to Cancer Gene Therapy」Cancer Gene Ther 2 (1995) pp 47以降参照のこと。アンチセンスポリヌクレオチドの利用のための技術は周知であり、そして有効な細胞環境において適切な公知のプロモーターの中から選定することにより選定された標的の配列と約12個のヌクレオチドの配列相補性の適当なヌクレオチド配列及びその他の公知の手

段を利用することにより本用途に必要な特異性に容易に適応できる。

例えば、標的遺伝子の発現を破綻するためのアンチセンスRNAの利用についての技術は明細書W094/26908 (Genetech : TG Warnerら

)に記載されている(シリアダーゼ遺伝子との関連で)。mRNA分子に特異的に結合できるアンチセンスオリゴヌクレオチドを利用するための技術は明細書W094/29342 (La Jolla Cancer Research Foundation and the Regents of the University of Michigan : R Sawadaら)にも記載されている(特に、ヒトの目由来のポリペプチドをコードするmRNAと関連で)。標的RNAに対して相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドについての技術は明細書W094/29444号 (Department of Health and Human Services : B Ensoli and R Gallo)に記載されている(塩基性線維芽細胞増殖因子RNAに適用)。mRNAに対して実質的に相補性である配列を有し、それ故標的核酸に対して相補性であるアンチセンスオリゴヌクレオチドの、標的の機能又は発現を阻害するために利用する技術はW094/24864号 (General Hospital Corporation : HE Blumら)に記載されている(B型肝炎ウイルス複製の阻害に適用)。アンチセンス技術についてはD Mercola and J S Cohen, ch. 7 pp 77-89, RE Sobol and K J Scanlon(編)「Internet Book of Gene Therapy : Cancer Therapeutics」(Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, 1995)を参照のこと。その他の標的特異性に対する適用は応用により容易にアクセス可能である。

遺伝子発現を破綻するためのリボザイムを利用する技術も公知である。例えば、標的RNAを切断又はそうでなければ標的遺伝子の発現を破綻するためのリボザイム(又はアンチセンスオリゴヌクレオチド)を作製及び投与するための技術は明細書W094/13793号 (Apollon : C J Pachukら)に記載されている(白血病に関連する一定のmRNAを標的とするリボザイムに適用)。リボザイム技術については、M Kashani-Sabet and K J Scanlon 第8章 pp 91-101 RE Sobol and K J Scanlon(編)「Internet Book of Gene Therapy : Cancer

Therapeutics」(Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, 1995)を参照のこと。

と。ここでもまた、その他の標的特異性への適用は応用により容易にアクセス可能である。

致死遺伝子もベクターに挿入して形質導入細胞を破壊させることができる：例えば、明細書W095/14100号 (Wellcome Foundation : C Richardsら) に記載の如き投与薬剤との関連で致死的であり、CEA プロモーターのコントロール下でシトシンデアミナーゼ(CDA)をコードする遺伝子を代表する遺伝子。これは細胞の中に導入されたとき、CDA により毒性5-フルオロウラシルへと変換される5-フルオロシトシンの投与との関係で致死的である。

本明細書記載の免疫調節タンパク質又はその他の遺伝子材料をコードする遺伝子を搬送するのに利用される組換えヘルペスウイルスは好ましくは衰弱化及び／又は複製欠陥型ヘルペスウイルスである。

突然変異ヘルペスウイルスは有効には任意の適当なヘルペスウイルスの突然変異体、例えば哺乳動物ヘルペスウイルスの非形質転換性突然変異体：例えば非形質転換性ヒトヘルペスウイルスの突然変異体、特に、例えば被覆化又は封入化突然変異ヘルペスウイルスであってよい。本発明の態様に従ってベクターとして提供及び使用されうるかかる突然変異体のヘルペスウイルスの例には、1型(HSV-1)又は2型(HSV-2)の単純ヘルペスウイルス、ヒト又は動物サイトメガロウイルス(CMV)、例えばヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、バリセラ・ゾスター・ウイルス(VZV)、及び／又はヒトヘルペスウイルス6及び7が含まれる。EBVは、非形質転換性突然変異体の形態を除いてはあまり所望されず、それはその正常な形質転換特性を理由とする。本発明の態様に従って提供するかかる突然変異体の動物ウイルスには、シュードラビエスウイルス(PRV)、ウマ及びウシヘルペスウイルス、例えばEHV 及びBHV 型、例えばIBRV、並

びにMarek 病ウイルス(MDV)及び近縁ウイルスが含まれる。

ヘルペスウイルス及びその多くの対応の同族体の遺伝子の命名法は様々であり、そしてその内容が許す限り、ヘルペスウイルスについての遺伝子の言及は、その遺伝子の同族体を有するその他のヘルペスウイルスとの関連で、対応の同族体についての言及を含んでいる。

本発明に係る利用に適するベクターを製造するための組換体の基礎として利用する適当なヘルペスウイルスには明細書W092/05263 (Inglisら: Immunology Limited) (その開示内容は引用することで本明細書に組入れる) の中の一般的又は特定の仕様に合う欠陥ヘルペスウイルスが含まれる。その明細書には、例えば、ゲノムが感染性ウイルスの生産に必須な遺伝子の観点において欠陥となっている突然変異ウイルスの免疫原又はワクチンとしての利用が記載されており、従ってこのウイルスは正常な宿主細胞に感染し、複製し、そしてかかる細胞の中でウイルス抗原遺伝子を発現することができるが、感染性ウイルスを生産することはできない。特にW092/05263号には、ウイルス感染能に必要とされる必須糖タンパク質H (gH) をコードする遺伝子の欠損により不能となったHSV ウイルスが記載されている (A Forrester ら、J Virol 66 (1992) 341-348)。gHタンパク質の発現がないと、ウイルスタンパク質のほぼ完全なレパートリーを供する非感染性ウイルス粒子が生産される。しかしながら、このような子孫粒子は宿主細胞に感染できず、従って宿主内でのウイルスの拡散が防がれる。かかるウイルスは動物モデルにおいて有効な免疫原及びワクチンであることが示されている (Farrell ら、J Virol 68 (1994) 927-932 ; McLeanら、J Infect Dis, 170 (1994) 1100-9)。

かかる突然変異ウイルスは、この突然変異ウイルスが欠陥となっ

ている観点において遺伝子生成物を発現する細胞系の中で培養できうる。

文献には単純ヘルペスウイルスのタンパク質を発現する細胞系も記載されている: gB糖タンパク質 (Cai ら、J Virol 61 (1987) 714-721)、gD糖タンパク質 (Ligas and Johnson, J Virol 62 (1988) 1486) 及び即時タンパク質 (Immediate Early protein) ICP4 (DeLuca ら、J Virol 56 (1985) 558)。これらも対応の遺伝子との関連で不活性化されたウイルスの複製を支持することができることが示されている。

完全又は実体的な配列データーがいくつかのウイルス、例えばヒトサイトメガロウイルス CMV (Weston and Barrell, J Mol Biol 192 (1986) 177-208)、バリセラ・ゾスター・ウイルス VZV (AJ Davison and Scott, J Gen Virol 67 (1986) 759-816) 及び単純ヘルペスウイルス HSV (McGeochら、J. Gen Virol 69 (1988

1531-1574及び下記に引用する他の文献)についてのそれが公開されている。gH糖タンパク質はCMV 及びVZV において相同性を有することで知られる (Desai ら、J Gen Virol 69 (1988) 1147)。

かかる遺伝子の適当な例は必須ウィルス糖タンパク質、例えば(後期)必須ウィルス糖タンパク質、例えばgH, gL, gD及び/又はgBについての遺伝子、並びにその他の必須遺伝子である。ヒトヘルペスウィルスの必須及びその他の遺伝子はD J McGeoch [The Genomes of the Human Herpesviruses], Ann Rev Microbiol 43 (1989) pp 235-265 ; D J McGeochらNuc Acids Res 14 (1986) 1727-1745 ; D J McGeochらJ mol Biol 181 (1985) 1-13の中のデーター及び引用文献より同定可能である。例えばCMV 及びVZV におけるgH糖タンパク質の相同性についての例えばDesai らJ Gen Virol 69 (1988) 1147に公開のデーターも参照のこと。

本発明においてウィルスベクターとして更に有用なのは例えば即時遺伝子発現をトランス誘導できず、そしてマウスに注射したときに本質的に弱毒性であるC I Ace らJ Virol 63(5)1989 pp 2260-2269に記載の HSV-1 突然変異 (1814) の如き突然変異体である。明細書WO91/02788号 (CM Preston & C I Ace : University of Glasgow) には、神経宿主細胞において後期感染を樹立することができ、且つ挿入治療遺伝子の発現を及ぼすことのできる1814に関与する有用 HSV1 突然変異体が記載されている。本発明において有用なウィルスベクターの更なる例はヘルペス即時遺伝子、例えば ICP0, ICP4, ICP22 及びICP27 に対立遺伝子における突然変異を基礎とする。突然変異は、例えば引用することで本明細書に組入れるWO96/04395 (P Speck : Lynxvalc) に開示の如き組合せで利用できる。本発明における利用のためのウィルスベクターとして更に適当なのは突然変異体1716の如き神経衰弱 HSV1 突然変異体である(B P Randazzoら、Virology 211 (1995) pp 94-101)。

ヘルペスウィルスについては、例えばヒトサイトメガロウィルスCMV (Weston and Barrell, J Mol Biol 192 (1986) 177-208) 及びバリセラ・ゾスター・ウィルス VZV(AJ Davisonら、J Gen Virol 57 (1986) 759-816)についての公開されたデーターを参照のこと。

以下に更に詳細する本発明の一定の例に従うと、遺伝子的に不活性化されたウイルス免疫原、例えばワクチンが免疫調節タンパク質をコードする遺伝子のための有用な担体を担う。ウィルスワクチンはワクチン化宿主の細胞に感染でき、免疫調節タンパク質の細胞内合成を供する。もし遺伝子的に不活性化したワクチンが外来抗原の搬送のためのベクターとしても働くなら、外来抗原に対する免疫反応が高まる又は改変されうる。

このような複製欠陥ウィルスはワクチン化宿主の細胞において1

サイクルの複製しかせず、そして新たなウィルス粒子を生産できないため、免疫調節タンパク質の生産は、感染が広がりうる複製コンピテントウィルスの状況に反して、ワクチンのサイズに制約される。更に、生産される免疫調節タンパク質の全体的な量は、強力な免疫応答を刺激するのに局所的には十分であるが、複製コンピテントウィルスにより生産されるものよりは少なく、そして有害な全身応答をあまり供しないであろう。

かかる好適な態様において、免疫調節又はその他のタンパク質をコードする遺伝子を通常含んで成る異種ヌクレオチド配列を突然変異ウィルスのゲノムの中に、欠失した必須の遺伝子の座において挿入し、そして最も好ましくは、異種ヌクレオチド配列は全体が欠失している遺伝子を完全に置換するものとする。このようにして、たとえ任意の不要な組換現象が起き、その結果野生起源から突然変異ウィルスへの欠失遺伝子の再挿入があったとしても、挿入異種ヌクレオチド配列はほとんど排除されているであろう。これは、異種ヌクレオチド配列のための複製コンピテントウィルス担体ができるであろう可能性を回避するであろう。かかる組換現象は非常に稀れであるが、本態様において、その発生の有害な効果は最少限とするであろう。

本発明に係る材料と方法は治療用ワクチンの如き細胞性免疫原により活性化される免疫学的エフェクターメカニズムを誘引するのに、特に標的抗原に対して特異的な特異的細胞障害性Tリンパ球(CTL)を誘引するのに利用できうる。かかるCTLは腫瘍細胞を認識及び破壊する性質による有利な効果を奏することができ、そして様々な診断及び／又は治療方法においてex-vivoで使用することもできる

。

腫瘍細胞と正常細胞との間に抗原性相違があるとき、腫瘍特異的

抗原が免疫応答を刺激する適正な形態において有用となっていることを前提に、それらは免疫系により認識されうる。これは腫瘍特異的マーカーの必要性を回避する。

CTL は宿主主要組織適合性複合体(MHC)抗原との関連で抗原認識を基礎とする。宿主細胞の細胞質内の抗原性標的よりできるペプチドは宿主MHC 分子と複合体を形成し、そして細胞表層へと輸送され、そこでそれらはCTL の表層上のレセプターにより認識されうる。

本発明により提供されるベクターを利用する一の方法は、従って、1又は複数の個体に由来する腫瘍材料からワクチンの如き細胞性免疫原を調製し、そして別の被検体、例えば患者の処置のためにこれを免疫原又はワクチンとして投与することにする。しかしながら、上記の理由のために腫瘍細胞に対するCTL 応答が所望されるなら、標的抗原は適正なMHC 分子との関連において供されるべきである。一の個体の腫瘍から調製した免疫原又はワクチンは従って常に、異なるMHC タイプを有する別の個体にとって適当であるわけではない。MHC 分子は個体間で異なるため、一般に、標的抗原に対するCTL 応答を活性化するため、適正なMHC との関連で免疫系に対応の標的抗原を供与することが必要である。従って、治療用ワクチンの如き免疫原として利用するため、一般に選定の標的抗原を処置した被検体又は患者自身の細胞の中に導入して適正なCTL 応答を供することが最良であると考えられる。

従って、腫瘍免疫原又はワクチンを患者自身の腫瘍細胞に基づかせることが特に有用であり得、それは自己ワクチン化として知られる手順である。このような利用の更なる主要な利点は、それに特定の腫瘍に固有でありうる抗原性標的の利点が備わっていることにある。腫瘍増殖を基礎とする非制御型細胞サイクルコントロールは、ある時間、新たな抗原決定基として明示される遺伝子変化の蓄積を

招きうると考えられる。尚、本発明の最後に記載した態様は自己ワクチン化手順

の問題、即ち自己腫瘍細胞の免疫原性が劣るという問題を回避又は解消しうる。

本発明の例に係る手順は、実験室の手順により被検体から取り出した腫瘍細胞への標的遺伝子の導入、その後のそのようにして処理した細胞の処置すべき被検体への再導入を包括しうる (ex-vivo 処置)。本発明の所定の例に従う別の手順は患者の腫瘍細胞に標的遺伝子を直接導入することにある (in vivo 処置)。in-vivo 手順の利点は患者の腫瘍細胞の実験室的な操作を必要としないことにある。欠点は有効な遺伝子形質導入が in vivo で達成されるものよりも困難でありうること、又は所望の度合を達成することがより困難でありうることにある。他に、非腫瘍細胞も当該ウィルスベクターにより有効にトランスフェクションされうる。

特定の例において、組換ヘルペスウィルスは、感受性細胞へのウィルスの侵入に関わるウィルス粒子の表層上に存在するタンパク質である糖タンパク質 H (gH) の遺伝子において欠失を担持する単純ヘルペスウィルスの不能形態を基礎とする。このウィルスはウィルスゲノムにおいて失われている必須機能を補完するプロデューサー細胞系の中でのみ複製できうる。組換補完細胞系の有用な例は、ウィルスベクターから欠失したものと同一 HSV gH 遺伝子を安定的に発現するように操作されたものである。プロデューサー細胞系から作られたウィルスはその構造の一部として細胞コード化 gH 遺伝子生成物を獲得しており、そして感染性である。このウィルス調製品は野生型ウィルスと同じようにして正常細胞に感染できる。一旦細胞に入ったら、このウィルスゲノムは細胞内で複製でき、そしてゲノムにより担持された遺伝子はタンパク質として発現されうる。しかしながら、欠陥ウィルスが正常細胞に感染するときの機能性 gH タンパ

ク質のなさは、新たな感染性ウィルス粒子の作製不良をもたらす。gH 欠失ウィルスはワクチン又は遺伝子導入媒体として投与が安全と考えられる。

ベクター、例えば癌免疫治療のための HSV ベクターは完全に不能であり、且つ処置宿主内で拡散できないことが好ましい。しかしながら、有用なベクターは臨床的な状況において利用するのに十分安全と認められている任意の HSV ウィルスを基礎としうる。また、かかる gH 欠失 HSV ゲノムに組込まれた異種遺伝子が、gH

遺伝子の除去された座に挿入され、相同組換による異種遺伝子の野生型HSV への変換が処置個体内で同時に起こりうることの危険性を最少限にすることも好ましい。しかしながら、異種遺伝子はその代わりにウィルスゲノム内の任意の位置に挿入してよい。

本発明の範囲における方法の更なる応用は、適当な遺伝子材料、例えば免疫調節タンパク質をコードする遺伝子をヘルペスウィルス粒子内にパッケージングされたヘルペスウィルスアンプリコンの形態で搬送することにある。アンプリコンDNA は、ヘルペスウィルスゲノムの複製起点とこのDNA をウィルス粒子へとパッケージングすることを指令しうるDNA 配列とを含むDNA である。かかるアンプリコンが細胞の中に対応のヘルペスウィルス（ヘルパーウィルス）と一緒に存在しているとき、アンプリコンDNA の発現はヘルペスウィルスDNA の発現と一緒に起こる。外来遺伝子のかかるアンプリコンの中にクローニングでき、それ故アンプリコン及びヘルペスウィルスにより感染された細胞の中で発現する。パッケージングされたアンプリコンを含む粒子は表現形式が対応のヘルペスウィルスと同等であることができ、それ故同じ宿主細胞に感染することができ、そして本明細書では欠陥突然変異ヘルペスウィルスの中で本発明の実施における利用に適切であると考えられている。即ち、ウィルスバ

ッケージングアンプリコンは選定のDNA を所望の細胞へと搬送するのに利用できうる。本発明の実施例における利用のために利用される又は容易に仕上げることのできるアンプリコン及びその調製は、更なる詳細と共に、WO96/29421 (Efsthathiouら : Cantab Pharmaceuticals Research Ltd and Cambridge University Technical Services Ltd.) に詳細に説明してある。

アンプリコンをパッケージングするために利用するHSV ヘルパーウィルスはそれ自身は宿主にとって有害ではなく、それ故欠失した必須遺伝子を有する不能ウィルスであることが好ましい。例えば上記のgH欠失ウィルスはWO92/05263及びその中に引用されているその他の関連文献に記載の如き理想的なヘルパーウィルスを担う。しかしながら、その他の有用なヘルパーウィルスは、臨床的状況において十分に衰弱又は不能となったヘルペスウィルスを基礎とするものであってよく

、全体的に複製欠陥のものである必要はない。

ここに記載の発明は、免疫調節タンパク質の如き選定のタンパク質をコードするDNAの如き選定の遺伝子材料を治療の目的のための腫瘍細胞へと搬送するのに利用できる。免疫応答の刺激の目的のために搬送できる遺伝子の範囲には、サイトカイン、免疫刺激因子、リンホタクチン、CD40、OX40、OX40リガンド及びその他の本明細書に記載の遺伝子材料であって単一遺伝子もしくは多重遺伝子として、又は1もしくは複数の遺伝子の多重コピーとしてベクターの中に含まれうるものが含まれる。

本発明の態様において、例えば本明細書の下記に特に記載のベクター及び標的細胞を利用することで、正常及び悪性ヒト造血先祖細胞は60~100%の範囲の効率で容易に形質導入されうる。達成される形質導入及び遺伝子発現のレベルは、特にこれらの標的に関し、非常に効率的であると考えられる。

本発明の態様は移入遺伝子の有用な迅速発現を供することもできる。例えば、本明細書に詳しく記載の条件下で、移入遺伝子の発現の陽性は、ベクターに曝露して24時間以内に、CD34+細胞並びにAML及びALL芽細胞で80~100%において得られた。本発明の態様は、例えばgH欠失ヘルペスウィルスベクターにより移入された対応の遺伝子の発現によりヒト一次白血病細胞において生産されるGM-CSFの場合、MOI(感染多重度：通常はプラーク形成単位(pfu/細胞)で計算)に比例するレベルで、例えば0.05~20の範囲のMOIで、少なくとも7日間にわたり移入遺伝子の生成物を生産及び例えば放出する形質導入細胞の調製を供しうる。

従って、本発明の態様は、対応の免疫原の製造が今日まで理論的な問題を示していた状況において、免疫原、例えばヒト白血病免疫原の製造を可能にする。〔たとえ、白血病芽細胞においても、例えば、一定の感受性細胞例において、レトロウィルス又はアデノウィルスベクターにより高レベルのサイトカイン生産を得ることが可能でありうる又は可能となりうる。本発明の態様は今までに試験した全ての患者より、有用な高い比率の形質導入すべき白血病芽細胞の一貫した達成を可能にすることが見い出され、それ故臨床実施における有用な利点を供する。〕

本発明を更に、例示のみであり、限定を意味しない手順及び生成物並びに手順及び生成物の一部の実施例の助けにより以下に更に説明する。

適当なベクターの構築体を、限定することなく、添付図面に示す：ここで、図1～6はそれぞれプラスミドpIMB45, pIMB56, pIMB46, pIMC14, pIMR1及びpIMR3の構築を例示する。これらのベクターは下記に詳しく説明する；

図7及び8は本発明の特定の態様に従う、下記の通りに構築した

遺伝子的に不能なヘルペスウイルスによる細胞の形質導入の結果を示す。

下記のベクター及びその構築体の説明は単に例示にすぎない。pH欠陥ウイルスの構築及び特性並びに適当な補完細胞系は明細書W092/05263号及びW094/21807号(Cantab Pharmaceuticals Research Limited : S C Inglisら) (引用することで本明細書に組入れる)、Forrester ら1992 J. Virol. 66, pp 341 以降、及びC S Mcleanら、J Infect Dis 170 (1994) pp 1100 以降に示されている。更に、遺伝子操作手順は全て「Molecular Cloning」A Laboratory Manual, eds. Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989に記載されている。

造血幹細胞の如き細胞へのベクターの搬送及びそれにより処置する患者への細胞の播種は当業界公知の技術の簡単な応用により実施できる。例えば、M K Brenner ら、Cold Spring Harbor Symposia in Quantative Biology vol LIX (1994) pp 691-697 もしくはその中に引用されている文献、又はM K Brenner らLancet 342 (1993年11月6日) pp 1134-1137もしくはその中に引用されている文献に記載の方法が容易に適用及び応用できる。

GM-CSFを発現するgH-欠失 HSV 1 及びgH-欠失 HSV 2 の構築

gH-欠失 HSV 1 ウィルス及びgH-欠失 HSV 2 ウィルスを補完細胞系の中で増殖させる。これらの細胞系は HSV- 1 gH 遺伝子又は HSV- 2 gH 遺伝子のそれぞれを発現するように操作されている。かかる細胞系はW094/05207及びW094/21807号並びにその中の引用文献の中に記載の通りに構築できる。以下の章は適当な細胞系の構築の更なる説明を担い、そして一定のプラスミドの構築で始まる：

HSV ウィルスDNA が必要なとき、それは例えば(HSV 2 の場合)Walboomers and

Ter Schegget (1976) Virology 74, 256-258 の方法

、又はその方法の適当な応用により株HG52から作ることができる。HG52株の選り抜きのストックがInstitute of Virology, MRC Virology Unit, Church Steet, Glasgow, Scotland, UK に保存されている。その他の HSV-2 株のDNA はこの領域に非常に似ているようであり、そして例えば株G及びMSはATCC, Rockville, Maryland, USAより入手できる。

プラスミドpIMC05の構築

HSV-1 (HFEM) gH遺伝子及び上流の HSV-1 gDプロモーター (-392 ~ +1) をコードする 4.3kbの Sst-I フラグメントをプラスミドpgDBrgh (Forresterら、前掲) から切り出し、そしてpUC119 (Vieira & Messing, 1987) の中にクローニングしてプラスミドpUC119gHを作った。Not I 部位を部位特異的突然変異誘発により、gH停止コドンの87bp下流にてプラスミドpUC119の中に導入した。得られるプラスミドpIMC03 をNot I - Sst I フラグメントを作るのに利用し、それをCMV IEプロモーターを除去するために Not I 及び Nru I で予め消化しておいた真核系発現ベクターpRc/CMV(Invitrogen Corporation)の中にライゲーションした。得られるプラスミドpIMC05はウィルス誘導性gDプロモーターのコントロール下にある HSV-1 gH 遺伝子及びBGH(牛成長ホルモン)ポリAを含む。これはまたG418耐性安定細胞系の選別のためのネオマイシン耐性遺伝子も含む。

gH-欠失 HSV-1 補完細胞系の構築

プラスミドpIMC05をリン酸カルシウム技術(Sambrook, Fritsch & Maniatis, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)を利用してVero(ATCC no. 88020401)細胞の中にトランスフェクションした。細胞をG418の存在下での希釈クローニングにより選別し、そしてクローン細胞系を単離した。増幅及び凍結

後、細胞を24穴プレートに播種し、そして0.1pfu/細胞でのSC16 (del) gH (Forresterら、前掲) による感染によりgH陰性ウィルスの増殖を支持するその能力について試験した。ウィルスプラークは感染3日後に観察され、gH遺伝子の発現を

確証した。

BHK TK細胞系の構築

これらの細胞は、gH欠失 HSV-1 及びgH欠失 HSV-2 補完細胞について記載したのと同じようにしてチミジンキナーゼ陰性 (TK) BHK 細胞 (ECACC No. 850114 23) にプラスミドpIMC005 をトランスフェクションすることにより作った。

プラスミドpIMC08の構築

HSV-2 gH 遺伝子を含むプラスミドpIMMB24 を HSV-2 株25766 の隣接し合う2個のBamHI フラグメントより構築する。約3484塩基対のBamHI R フラグメントを含むプラスミドpTW49 及び約3311塩基対のBamHI S フラグメントを含むプラスミドpTW54 の双方をpBR322のBamHI 部位の中にクローニングする。同等のプラスミドが HSV-2 の数多くの有用な株又は臨床単離物から容易にクローニングできる。HSV-2 遺伝子の5' 末端をBamHI 及び Kpn I を用いてpTW54 から切り出して2620塩基対のフラグメントを作り、それをゲル精製する。HSV-2 gH 遺伝子の3' 末端をBamHI 及び Sal I を用いてpTW49 から切り出して870 塩基対のフラグメントを作り、それもゲル精製する。2本のフラグメントをSalHI 及び Kpn I で消化しておいたpUC119の中にクローニングする。このプラスミドはこれにより HSV-2 gH 遺伝子全体を含む。

HSV-2 (株 25766) gH遺伝子を含むプラスミドpIMC08を下記の通りにして構築した。プラスミドpIMMB24 を Nco I 及びBstXI で消化し、そしてgH遺伝子の中央部を含むフラグメントをアガロースゲルから精製した。この遺伝子の5' 末端を2本のオリゴヌクレオチ

ドCE39及びCE40より再構築し、それはHindIII及び Nco I 部位により境界形成された凍結配列を形成する。

この遺伝子の3' 末端は2本のオリゴヌクレオチドCE37及びCE38により再構築し、それはBstXI 及び Not I 部位により境界形成された連結配列を形成する。

CE39 5' AGCTTAGTACTGACGAC 3'
 CE40 5' CATGGTCGTCAGTACTA 3'
 CE37 5' GTGGAGACGCGAATAATCGCGAGC 3'
 CE38 5' GGCCGCTCGCGATTATTCGCGTCTCCACAAAA 3'

2本のオリゴヌクレオチドリンカー及び精製 Nco I - BstX I gHフラグメントを三重ライゲーションでHindIII - Nco I 消化pIMC05にクローニングし、これにより HSV-1 gH 遺伝子を HSV-2 gH 遺伝子に置き換えた。得られるプラスミドをpIMC08と命名する。

gH欠失 HSV-2 相補性細胞系 (CR2) の構築

プラスミドpIMC08はウイルス誘導性gDプロモーターの転写コントロール下にある HSV-2 gH 遺伝子及びBGH(牛成長ホルモン)ポリAを含む。これは更にG418耐性安定細胞系の選別のためのネオマイシン耐性遺伝子も含む。プラスミドpIMC08をリン酸カルシウム技術 (Sambrook, Fritsh & Maniatis, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) を利用してVero(ATCC no. 88020401)細胞の中にトランスフェクションした。細胞をG418の存在下での希釈クローニングにより選別し、そしてクローン細胞系を単離した。増殖及び凍結後、CR2細胞を命名したこれらの細胞を24穴プレートに播種し、そしてgH欠失 HSV-1 (SC16 (del) gH)により0.1pfu/細胞で感染させた。ウイルスプラークを感染後3回目に観察し、gH遺伝子の発現を確認した。

組換プラスミドの構築

a) pIMMB56+

pIMMB56 はgH遺伝子の片側に HSV-2 配列の隣接したlacZカセットを有するベクターである。これは下記の通りに調製した：オリゴMB97-MB96及びオリゴMB57-MB58により作られた2本のPCR フラグメントを、PCR オリゴヌクレオチドに含まれる部位に適する制限酵素で消化する。MB97-MB96フラグメントをHindIII及びHpa I で消化する。MB57-MB58フラグメントは Hpa I 及びEcoR I で消化する。次いでこれらのフラグメントをHindIII及びEcoR I で消化したベクターpUC119の中にライゲーションする。得られるプラスミドをpIMMB45と呼ぶ (図1)。

PCR のために用いたオリゴヌクレオチドを下記に示す：

Hind III

MB97 : 5' TCGAAGCTTCAGGGAGTGGCGCAGC 3'

Hpa I

MB96 : 5' TCAGTTAACGGACAGCATGGCCAGGTCAAG 3'

Hpa I

MB57 : 5' TCAGTTAACGCCTCTGTTCCCTTCCCTTC 3'

EcoR I

MB58 : 5' TCAGAATTCGAGCAGCTCCTCATGTTGAC 3'

第一段階組換体の検出をし易くするため、SVプロモーターのコントロール下で E. コリバクターガラクトシダーゼ遺伝子を pIMMB45 の中に挿入する。SV40プロモーターとベクターガラクトシダーゼ遺伝子を BamH I 及び TthIII 1 を利用してプラスミド pCH110(Pharmacia)から切り出す。その先端をDNA ポリメラーゼのクレノウフラグメントを用いて補完する。このフラグメントをゲル精製する。プラスミド pIMMB45 を Hpa I で消化し、子牛小腸アルカリホスファターゼ (CIAP) でホスファターゼ処理して自己ライゲーションをなくし、

そしてゲル精製する。ゲル精製したフラグメントを互いにライゲーションさせてプラスミド pIMMB56+を作る (図 2 参照)。

b) pIMMB46

pIMMB46 は HSV-2 gH 遺伝子に隣接する配列を含み、中央に固有 Hpa I 部位を有する。この部位にクローニングされた任意の遺伝子は HSV-2 ゲノムの中に gH 座において組換により挿入されうる。もしこのウィルスが TK 陰性 gH 陰性ウィルス (例えば、上記の pIMMB56+ プラスミドを用いて作製) なら、このプラスミドを TK 遺伝子の 3' 末端に置き換え、TK 活性を保存及び TK 陽性ウィルスについての選択を可能にする。

オリゴ MB94-MB109 により及びオリゴ MB57-MB108 により作った 2 本の PCR フラグメントを PCR オリゴヌクレオチドの中に含まれる部位に適する制限酵素で消化する。MB94-MB109 フラグメントを HindIII 及び Hpa I で消化する。MB57-MB1

08 フラグメントを Hpa I 及びEcoR I で消化する。これらのフラグメントをHindI II及びEcoR I で消化したベクターpUC119の中にライゲーションさせる。得られるプラスミドをpIMMB46 と称する（図3参照）。使用したオリゴヌクレオチドは下記の通りである：

Hpa I

MB57: 5' TCAGTTAACGCCTCTGTTCCCTTCCCTTC 3'

EcoR I

MB108: 5' TCAGAATTCGTTCCGGGAGCAGCGTGGA 3'

HindIII

MB94: 5' TCAAAGCTTATGGCTTCTCAGCCGGCCAA 3'

Hpa I

MB109: 5' TCAGTTAACTGCACTAGTTTAAATTAATACGTATG 3'

c) pIMC14

プラスミドpRc/CMV(Invitrogen Corporation)を制限酵素 Nru I , PvuII及びBsm I で消化し、そして1066塩基対 Nru I - PvuIIフラグメントをアガロースゲルから単離した。このフラグメントを Hpa I 消化したpIMMB46 の中にクローニングした（図4参照）。得られたものをpIMC14と命名する。

pRc/CMV フラグメントはサイトメガロウィルス主要即時プロモーター（CMV-IEプロモーター）及び牛成長ホルモン(BGH)ポリA付加部位を含む。このプラスミドpIMC14は外来遺伝子の挿入のための固有部位を有する一般の組換えプラスミドであり、これは HSV-2 gH 欠失DISCベクターの中に組換えすることができる。

d) pIMR1

プラスミドpIMR1はDISC HSV-2ベクターへの、CMV-IEプロモーターのコントロール下でのマウスGM-CSF遺伝子の挿入のための組換えベクターである。pIMC14を Xba I で消化し、CIAPでホスファターゼ処理し、ゲル精製し、そして突き出し先端をクレノウポリメラーゼで平滑にする。マウスGM-CSF遺伝子をプラスミドpGM 3.2 FF (Gough ら、EMBO Journal 4,645-653, 1985ではpGM 3.2 と称されている) から（又は前記の通りに構築した同等のプラスミドから）、2段階手順によ

り切り出す。まずpGM 3.2 FFをEcoRIで消化し、そして1048塩基対のフラグメントをゲル精製する。次いでこのフラグメントをHinfI及びStuIで消化する。495塩基対のフラグメントをゲル精製し、そしてその末端をクレノウフラグメントで修復する。次いでこのフラグメントを上記の通りに調製したpIMC14の多重クローニング部位の中にクローニングする。得られるプラスミドをpIMR1と命名する(図5参照)。

pGM3.2と同等の別のプラスミドは下記の通りに構築できる。cDNAクローンのライブラリーをクローン化T-リンパ球系(マウスのBA

LB/c株由来)、例えばLB3 (Kelso ら、J Immunol. 132, 2932, 1984) から構築する。それにおいては、GM-CSFの合成はコンカナバリンAにより誘導される。このライブラリーをマウスGM-CSF遺伝子に特異的な配列によるコロニーハイブリダイゼーションにより探索する(配列については、Gough ら、EMBO J. 4, 645, 1985を参照)。この場合に有用なオリゴヌクレオチドの例は5' TGGATGACAT GCCTGTCACA TTGAATGAAG AGGTAGAAGT 3'である。1 kbを超えるクローンを拾い、そして配列決定してGM-CSFであるか検定する。これらの操作は「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harborに記載の通りに実施できる。かかる操作はpGM 3.2に記載の如きHinfI及びStuIで切り出すことのできる完全GM-CSF配列を含むクローンをもたらす。

e) pIMR3

プラスミドpIMR1において、GM-CSF遺伝子についてのオープンリーディングフレームには15塩基対の短いオープンリーディングフレーム(ORF)が先行する。これがGM-CSFの発現を妨害しうるため、プラスミドpIMR1を改変してこの小さなオープンリーディングフレームを除去した。pIMR1をNotI及びPpuMIで消化した。消化したベクターを小牛小腸アルカリホスファターゼ(CIAP)でホスファターゼ処理し、そしてゲル精製した。2つの制限酵素部位の間の配列を2本のオリゴヌクレオチドCE55及びCE56のアニーリングにより作った短い二本鎖DNAに置き換えた:

CE55 GCGCGCTCGAACATGGCCACGAGACAAAGGCTAAG

CE56 GACCTTAGCCTTTCTCTCGTGGGCCATGTTTCGAGC

オリゴヌクレオチドを、pIMR1の消化によりできる Nco I 及び PpuM I 末端と適合する突き出し末端を有するように構築する。2本のオリゴヌクレオチドをアニールし、リン酸化し、そして Nco I - Pp

uM I 消化したpIMR1にライゲーションする。得られるベクターをpIMR3と命名する。この配列の対応の領域を下記に示す：

pIMR1

```
TTAATACGAC TCACTATAGG GAGACCGGAA GCTTGGTACC GAGCTCGGAT
CCACTAGTAA CGGCCGCCAG TGTGCTGGAA TTCTGCAGAT ATCCATCACA
CTGGCGGCCG CTCGAGCATG CATCTAGCCT TTTGACTACA ATGGCCCACG
          Not I          短 ORF          GM-CSFの開始
AGA GAAAGGCTAA GGTCCTG
                  PpuM I
```

pIMR3

```
TTAATACGAC TCACTATAGG GAGACCGGAA GCTTGGTACC GAGCTCGGAT
CCACTAGTAA CGGCCGCCAG TGTGCTGGAA TTCTGCAGAT ATCCATCACA
CTGGCGGCCG CTCGAACATG GCCCAGGAGA GAAAGGCTAA GGTCCTG
          Not I          開始          PpuM I
```

GM-CSFタンパク質を発現する HSV-1 DISC ウィルスを作るため、様々なプラスミドのセットを作る：

f) pIMMB34

これは HSV-1 gH 遺伝子の隣接する配列を含む組換えベクターである。左側に隣接する配列はgH遺伝子の隣りにあるTK遺伝子を不活性化する。オリゴMB97-MB100 及びオリゴMB61-MB58により作った2本のPCR フラグメントをPCR オリゴヌクレオチドの中に含まれる部位に適する制限酵素により消化する。MB97-MB100フラグメントをHindIII及び Hpa I で消化する。MB61-MB58フラグメントは Hpa I 及びEcoR I で消化する。これらのフラグメントをHindIII及びEcoR I で消化したベクターpUC119の中にライゲーションする。得られるプラスミドをpIMMB34 と称する。使用したオリゴヌクレオチドは下記の通りである：

Hind III

MB97 : 5' TCGAAGCTTCAGGGAGTGGCGCAGC 3'

Hpa I

MB100 : 5' TCAGTTAACGGCCAGCATAGCCAGGTCAAG 3'

Hpa I

MB61 : 5' TCAGTTAACAGCCCTCTTTGCTTCCCTC 3'

EcoR I

MB58 : 5' TCAGAATTCGAGCAGCTCCTCATGTTGAC 3'

g) pIMB55+

第一段階組換体の検出をし易くするため、SVプロモーターのコントロール下で E. コリバクターガラクトシダーゼ遺伝子をpIMB45 の中に挿入する。SV40プロモーターとベクターガラクトシダーゼ遺伝子をBamH I 及び TthIII 1 を利用してプラスミドpCH110(Pharmacia)から切り出す。その先端をDNA ポリメラーゼのクレノウフラグメントを用いて補完する。このフラグメントをゲル精製する。プラスミドpIMB34 を Hpa I で消化し、子牛小腸アルカリホスファターゼ (CIAP) でホスファターゼ処理して自己ライゲーションをなくし、そしてゲル精製する。ゲル精製したフラグメントを互いにライゲーションさせてプラスミド pIMB55+ を作る。

h) pIMB63

pIMB63 は HSV-1 株 KOS (m) DNA より作る。pIMB63 は HSV-1 gH 遺伝子に隣接する配列を含み、中央に固有 Hpa I 部位を有する。この部位にクローニングされた任意の遺伝子は HSV-1 ゲノムの中にgH座において組換により挿入されうる。もしこのウイルスがTK陰性ウイルス (例えば、上記の pIMB55+ プラスミドを用いて作製) なら、このプラスミドをTK遺伝子の3' 末端に置き換え、TK活性を保存及びTK陽性ウイルスについての選択を可能にする。

オリゴMB96-MB63により及びオリゴMB61-MB58により作った2本のPCR フラグメントをPCR オリゴヌクレオチドの中に含まれる部位に適する制限酵素で消化する。MB98-MB63フラグメントをHindIII及び Hpa I で消化する。MB61-MB58フラ

グメントを Hpa I 及び EcoR I で消化する。これらのフラグメントを HindIII 及び EcoR I で消化したベクター pUC119 の中にライゲーションさせる。得られるプラスミドを pIMMB63 と称する。使用したオリゴヌクレオチドは下記の通りである：

Hind III

MB98 : 5' TCAAAGCTTATGGCTTCGTACCCCTGCCAT 3'

Hpa I

MB63 : 5' TCAGTTAACGGACCCCGTCCCTAACCCACG 3'

Hpa I

MB61 : 5' TCAGTTAACAGCCCGTCTTTGCTTTCCCTC 3'

EcoR I

MB58 : 5' TCAGAATTCGAGCAGCTCCTCATGTTGAC 3'

i) pIMX1.0

このプラスミドは外来遺伝子の挿入のための固有部位を有する一般の組換プラスミドであり、これによりその遺伝子は HSV-1 gH 欠失 DISC ベクターの中に組換えすることができる。プラスミド pRc/CMV を Nru I 及び PvuII で消化し、そして CMV IE プロモーター及びポリ A シグナルを含む 1066bp のフラグメントをクレノウポリメラーゼで平滑末端にし、そしてプラスミド pIMMB63 の固有 Hpa I 部位に挿入した。このプラスミドを pIMX1.0 と命名した。CMV IE プロモーターとポリ A シグナルとの間に含まれる多重クローニング部位はその他の遺伝子をプラスミドの中にクローニングし、そしてその後 DISC HSV-1 に導入するのに理想的である。

j) pIMX3.0

プラスミド pIMX3.0 は CMV IE プロモーターのコントロール下でマウス GM-CSF を 1 型 DISC HSV の欠失 gH 領域の中に挿入するための組換ベクターである。このプラスミドは Sma I 及び Dra I によりプラスミド pCM 3.22 FF (前掲) から切り出したマウス GM-CSF を pIMX1.0 の固有 BamH I 部位に挿入することにより構築した。このプラスミド pIMX3.0 は pIMR3 の HSV-1 同等品である。

組換ウィルスの構築

GM-CSFを発現する組換ウイルスを2段階で作った。第一段階ではgH遺伝子、及びTK遺伝子の一部を、E. コリlacZ遺伝子を駆動させるSV40プロモーターより成る「lacZカセット」により置き換える。このウイルスはTKマイナス表現型を有し、そしてまた発色原基質X-galを含む上層のもとで増殖させたときに青色のプラークを供する。この組換ウイルスはこれによりgH座において外来遺伝子の挿入のために好適に利用されうようになる。遺伝子をTK遺伝子の欠失部と一緒に挿入する。同時に、lacZカセットを除去する。これらのウイルスはTK陽性表現型及びX-gal下での白色に基づいて選別できうる。

a) SV40-lacZカセットをgHに置き換えることによる第一段階組換体の構築

組換ウイルスをプラスミド pIMB56+ (HSV-2のため)又は pIMB55+ (HSV-1のため)によるウイルスDNAのトランスフェクションにより構築した。ウイルスDNAをWalboomers & Ter Schegget (1976) Virology 74, 256-258に記載の通りにしてヨウ化ナトリウム勾配上で精製する。

組換は下記の通りに実施する：

a) 第一段階

5 μ gのウイルスDNA, 0.5 μ gの線状化プラスミドDNA(制限酵素 Sca Iによる消化により線状化)を1 mlのHEBSバッファー(137mMのNaCl, 5 mMのKCl, 0.7mMのNa₂HPO₄, 5.5mMのグルコース、20mMのHepes, pH7.05)の中で混合することによりトランスフェクション混合物を調製する。70 μ lの2 MのCaCl₂を滴下し、そして静かに混合する。培地をCR1又はCR2細胞(gH発現性Vero細胞)の半集密5 cm皿から除去し、そして500 μ lのトランスフェクション混合物を2枚の皿それぞれに加える。細胞を37℃で40分インキュベーションし、次いで5%の胎児牛血清(FCS)を含む増殖培地4 mlを加える。トランスフェクション混合物を加えてから4時間後、培地を除去し、そして細胞を無血清培地で洗った。細胞を皿当たり15%のグリセロール500 μ lで2分ショックを与える。グリセロールを除去し、細胞を無血清培地で2回洗い、そして5%のFCSを含む増殖培地を加える。

4～7日後、完全ウイルス細胞病理効果(CPE)が観察されたら、細胞を培地の中にかき落とし、2500rpmで5分4℃で遠心分離し、そして120 μ lのイーグル最

少必須培地 (EMEM) の中に再懸濁する。これでこれは野生型及び組換ウイルスを含む粗ウイルスストックとなる。このストックを凍結し、融解し、そして音波処理し、次いで一定の希釈率でCR1細胞に基づいて組換体についてスクリーニングする。この培地はTKマイナスウイルスを選別するために $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のアシクロビルを含む。ウイルス希釈品の添加後、細胞に1%の低ゲル化温度のアガロースを含む培地を載せる。約3回目にウイルスプラークの出現後、 $330\mu\text{g}/\text{ml}$ のXgal及び $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のアシクロビルを含むアガロースの第二層を加える。48時間以内に青色のプラークを拾い、そしてCR1細胞を含む24穴皿 (ウェル当り 1cm^2) に移す。プラークを完全CPEにまで増殖させ、そして培地にかき落と

すことにより回収する。プラーク精製の多重ラウンドをウイルスの純粋ストックが得られるまで実施する。

第一段階の組換体の構造を下記の通りに確認する。ヨウ化ナトリウム精製したウイルスDNAを上記の通りに調製し、そしてBamHIで消化する。この消化物をアガロースゲル上で分離し、そしてナイロン膜に転写する。これをgH遺伝子の片側の配列に相同性な放射能ラベルしたDNAフラグメントでプローピングする。

b) 第二段階

組換を第一段階組換体由来のウイルスDNA、及びプラスミドpIMR3 (HSV-2のため)又はpIMX3.0 (HSV-1のため)を用い、前記の通りに実施する。ウイルスの一次回収後、TK陽性組換ウイルスをBHK gH陽性TK陰性細胞上での、 $0.6\mu\text{M}$ のメトトレキサート、 $15\mu\text{M}$ のチミジン、 $9.5\mu\text{M}$ のグリシン、 $4.75\mu\text{M}$ のアデノシン及び $4.75\mu\text{M}$ のグアノシンの存在下での増殖により選別する。アラウンドのこの選別を6穴皿 (ウェル当り 10cm^2) の中で実施する。各段階において、感染細胞を培地の中にかき落とすことにより回収し、そして $200\mu\text{l}$ のEMEMの中に再懸濁する。音波処理後、その $50\mu\text{l}$ を新鮮なBHK gH陽性TK陰性細胞に加え、そして選別を続ける。

最終選別後、ウイルス感染細胞を前述のように回収し、そしてgH欠失 HSV1 補完細胞に基づいてスクリーニングする。前述の通りに上層を加え、そしてプラークをXgalの存在下で選別する。前述の通りにプラークを拾い、そして前述gH欠失

HSV 1 補完細胞で3回プラーク精製する。

ウィルスDNAの構造を前述の通りに分析する。

GM-CSFアッセイ

Cos 1 細胞 (ECACC No. 88031701) にプラスミドDNAを、DEAEデキストランを用い、Gene Transfer and Expression, A Laboratory

Manual, Michael Kriegler に記載の通りにしてトランスフェクションする。トランスフェクションした Cos 1 細胞又は感染CR2細胞由来の上清液をバイオアッセイによりGM-CSF活性についてスクリーニングする。IL-3 / GM-CSF応答性マウス造血細胞系C2GMをDr. E. Spooncer, Paterson Institute for Cancer Research, Christia Hospital, UKより入手した。細胞系C2GMを20%のウマ血清、1%のグルタミン及び10%のコンディショニング培地を有するFischer 培地の中で維持する。コンディショニング細胞培地はマウスIL-3を培地の中に分泌するWehi 3 b細胞 (ECACC No. B6013003) の対数増殖培地より入手する。Wehi 3 b細胞をRPMI 1640 培地、10%のFCS 及び1%のグルタミンの中で維持する。

以上の説明は特に、gH陰性であり、且つGM-CSFを発現等する HSV-1 及び HSV-2 突然変異体の構築を可能にする。

当業者は本教示を、感染性ウィルスの製造に必須である第一遺伝子との関連において欠陥であるその他の突然変異ウィルスの調製に容易に応答することができ、これによりこのウィルスは、正常細胞に感染し、そしてこれらの細胞の中で複製及びウィルス抗原を発現することができるが、いわゆる感染性ウィルスを産生することはできず、しかも免疫調節性タンパク質又は本明細書に記載のその他の遺伝子材料をコードする異種ヌクレオチド配列を発現する。

数多くのその他の突然変異ウィルスが下記のウィルス及びウィルスタイプにおける下記の必須遺伝子の欠失又は（例えば）その他の不活性化に基づいて作ることができる：

単純ヘルペスウィルスにおいて、必須遺伝子、例えばgB, gD, gL, ICP4, ICP8 及び／又はICP27 は、欠失しているかもしくは不活性化しているか、又は上記の実施例に用いたgH遺伝子を代替してよい。その他のヘルペスウィルスにおい

て、既知の必須遺伝子、例

えばHSV のgB, gD, gL, gH, ICP4, ICP8 及び／又はICP27 遺伝子に対する任意の既知の同族体が欠失又は不活性化のために選定できうる。サイトメガロウィルスは、例えばDionら、*Virology* 158 (1987) 228-230 より同定可能な感温性突然変異を司る遺伝子を欠失させる又は活性化させることにより遺伝子的に不能することができる。

細胞の形質導入のためのベクターの利用：

本発明に係るいくつかの有用な例の製造に応用できる手順は下記の通りである：

gH遺伝子を欠き、そして欠失遺伝子座において選定の遺伝子の機能性コピーを担持している組換 HSV-2 ウィルスを上記の通りに培養し、そして約 10^8 pfu/ml の力価をもつストックを調製する。

白血病細胞を基礎とする形質導入手順を実施するため、血液サンプルを白血病患者から採取し、そして細胞を密度勾配遠心分離によりそれから単離する。別の態様において、細胞系は癌患者より生検等によって得ることができ、そして直接又はin vitro培養を経て利用できうる。固形腫瘍を有する患者由来の細胞は腫瘍もしくは転移物の外科的除去を経て、又は腫瘍もしくは転移物由来の生検材料から得られうる。腫瘍生検又は再切除材料は機械的もしくは酵素的解離により、又はその他の周知の方法により単一細胞懸濁物を調製するのに利用できうる。

選定の遺伝子（例えばGM-CSF）を担持する組換欠陥HSV ベクターによる腫瘍細胞又は細胞系の感染／トランスフェクションはin vitroで、単一細胞懸濁物のアリコートをして24穴プレート又はフラスコの如き適当な組織培養槽の中に分注することにより実施できる。適当な細胞濃度は1又は2 mlの培地において $0.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞／ウェルである。次いでウィルスを例えば0.01～20、例えば0.05～0.1

pfu/細胞、又は1以下又は約5以下のpfu/細胞の感染多重度で加えてよく、そしてその培養物を2 h インキュベーションしてウィルスを細胞に侵入させる。過剰なウィルスは標準的な方法で洗い出す。その細胞は免疫治療及びその他の本明細

書記載の目的のために、直接、又は例えば1～7日間の様々な時間にわたり新鮮培地の中で培養した後に利用できる。試験目的のため、下記の試験実験のように、培養を1～7日間実施する。

ウィルスベクターにより感染された細胞のサンプルをウィルスベクター内に担持された異種遺伝子の発現について検査することができる。例えば、*lacZ*遺伝子を含む組換欠陥HSVベクターで感染された細胞は、 β -ガラクトシダーゼに対して特異的な抗体又は抗血清調製品を利用することにより、又は β -ガラクトシダーゼによる切断に基づき蛍光生成物を供するガラクトシダーゼ基質（例えばフルオリポーター（TM））を利用することにより、 β -ガラクトシダーゼ活性の存在について試験することができる。蛍光生成物又は抗体は蛍光顕微鏡又はフローサイトメトリーにより検出できうる。蛍光を示す細胞の比率（%）は遺伝子生成物を発現する比率を示し、そして検出段階の結果から計算できる。

悪性及び正常細胞の中での*lacZ*の形質導入及び発現：

組換ウィルスベクターを利用する本発明に係る形質導入の有効性を試験及び例示する適当な試験方式は下記の通りであり、そしてヘルペスウィルスベクターのその他の例に応用できる。ここに記載の試験に利用するベクターは*lacZ*リポーター遺伝子を含む：一般にリポーター遺伝子の代わりに（又はその追加として）免疫調節タンパク質もしくはその他のタンパク質をコードする遺伝子、又は本明細書に記載のその他の遺伝子材料を有する別のベクターを本発明の実施に利用する。

lacZ gH-欠陥HSV突然変異体を本明細書において「第一段階」突然変異ウィルスに関して上記した通りに構築した。免疫調節タンパク質についての遺伝子を含むベクターの製造におけるこの第一段階は下記の試験手順に利用する適当な試験ベクターである。他方、かかる突然変異体はW094/21807に記載の「第一段階」組換体に関するW094/21807に記載の通りにして構築することもでき、その構築はその頁28行28～頁29行28に記載されている（引用することで本明細書に組入れる）。*lacZ*遺伝子は試験及びマーカー遺伝子としてここで利用する。本明細書記載の技術を利用し、その他の有用な遺伝子を*lacZ*の代わりに又は*lacZ*と同様に容易

に組込むことができる。

β -ガラクトシダーゼマーカー遺伝子の発現を誘導する組換欠陥型HSV ウィルスベクター HSV-lacZの能力を下記の様々な腫瘍細胞タイプにおいて例示のために研究した：

A：急性リンパ芽腫白血病由来の2種の細胞系（ALL）（臨床サンプルに由来し、そして10%のFCS(Biowhittaker, Walkersville, MD), 100IU/mlのペニシリン及び 100 μ g/mlのストレプトマイシン (Biowhittaker) 及び2mmol/lのL-グルタミンの入ったRPMI 1640(Biowhittaker)の中で培養したSt Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN で樹立されたAD及びRSヒトプレ-B-白血病細胞系)；

B：神経芽腫 (NB) 由来の3種の細胞系；

C：ALL を有する4人の患者から単離したばかりの一次細胞；

D：急性骨髄白血病(AML)を有する3人の患者由来の一次細胞；

並びに

E：NBを有する2人の患者由来の一次細胞。

白血病芽細胞を末梢血液又は骨髄単核細胞のFicoll沈殿により>80%の芽細胞を有する患者から単離した。骨髄芽球は上記の通りに

添加の放たれたRPMIの液体培地 (Biowhittaker) の中に維持してよい。リンパ芽球は液体培地の中に維持するか、又は必要なら間質支持体として同種異系皮膚線維芽細胞上に維持してよい。

細胞系は単離したばかりの細胞をそれぞれ1又は2mlの培地の中で $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/ウェルにおいて24穴プレートの中で単一細胞懸濁物としてプレート培養した。組換欠陥HSV ウィルスベクター HSV-lacZを0.05~0.1 pfu/細胞の多重度で加え、そして37℃で2hインキュベーションした。過剰のウィルスを除去し、新鮮な培地を加え、そして培養物を37℃にて様々な時間インキュベーションした。有効なトランスフェクションをフローサイトメトリーにより決定し、そして測定は感染後2日及び7日目に行った。感染細胞を染色し (xgal及び標準蛍光体)、そしてlacZの産生についてチェックした。

以下の結果が得られた：双方のALL 細胞系について、ベクターにより搬送された β -ガラクトシダーゼ遺伝子についての形質導入効率は2及び7日目の双方で100%であった。

一次ALL 細胞サンプルに関し、2つは β -ガラクトシダーゼ発現に関して100%陽性であり、そして他の2つは、2日目に80%以上の形質導入効率を示した。

(これらの細胞は間質抜きでの培養では生存せず、それ故7日目に試験できなかった。)

3種の一次AML サンプルのうちの2つが80%以上の形質導入効率を示した。その数日は7日目に更に上昇した。

第3のサンプルは若干低めの効率を示した(2日目に42%、そして7日目に54%)。

2日目に、3つのNB細胞系はそれぞれ25%、72%及び74%の形質導入効率を示し、一方2つの一次NB細胞サンプルは65%及び100%の形質導入を示した。

これらの結果は従来その他の手段により形質導入するのが困難と実証されていた細胞への異種遺伝子の形質導入についての組換欠陥HSV ベクターの高い能力を実証する。ALL 及びAML に関し、レトロウイルス形質導入は細胞系の作製を要し、そしてそれでさえも、遺伝子導入の効率は非常に低かった(<5%)。ALL 及びAML に由来する新鮮な細胞又は細胞系はアデノウイルス形質導入に対して本質的に耐性であると考えられている。

組換欠陥HSV ベクターは新鮮なNB細胞及びNB細胞系の形質導入についての驚くべきほどに高い能力を示した。3種のNB細胞系、のうちの2つについての形質導入効率は>70%であり、そして新鮮な単離物についてはそれぞれ65%及び100%であった。

その結果を以下にまとめる：

細胞タイプ	2 日 目		7 日 目	
	陽 性	生存率	陽 性	生存率
ALL 細胞系 - AD	100	30	100	56
ALL 細胞系 - RS	100	31	100	53
新鮮 ALL - LI	100	77		
新鮮 ALL - SP	100	81		
新鮮 ALL - BR	91	87		
新鮮 ALL - RU	85	100		
新鮮 AML - RE	80	50	95	40
新鮮 AML - BA	86	62	86	91
新鮮 AML - TE	42	90	54	20
NB細胞系 - MC	72	100		
NB細胞系 - JF	74	100		
NB細胞系 - NH	25	100		
新鮮 NB - RE	65	100		
新鮮 NB - HI		100	ND	

一次骨髓細胞における lac の形質導入及び発現を下記の通りに実施した：

骨髓を2人の正常ドナーから得た。単核画分 (Ficoll沈殿による) を抗-CD34 カラム (Cellpro, Seattle, WA) に通し、CD34+先祖細胞集団を濃厚にした。これらの細胞を上記の lacZ をコードする不能ヘルペスウイルスに 0.05~20 (pfu/細胞) に範囲する様々な感染度 (MOI) で曝露した。2時間の曝露後、細胞を2つに分け、そして間質支持培養物の中で又はサイトカインを有する培養物の中で下記の通りに維持することができる。 $8 \times 10^5 / \text{cm}^2$ の表面積を有する間質支持培養物を 15% の馬血清及び 5% の胎児牛血清 (FCS : Summit Biotechnology, Ft Collins, CO) 、 $1 \times 10^6 \text{ mol/l}$ のヒドロコルチゾン (Abbott, Chicago, ILL) 、 $1 \times 10^4 \text{ mol/l}$ のメルカプトエタノール (Sigma, St. Louis, MO) 及び $400 \mu \text{l/ml}$ のトランスフェリン (Life Technologies) を含む Fisher 培地 (Life Technology, Grand Island, NY) の中に樹立させた。細胞を 25ml の組織培養フラスコ (Nunc, Roskilde, DK) の中で 37°C で培養した。2週間毎に消費培地の半分を、間質層が完全に

樹立するまで、新鮮培地と交換した。間質細胞はフィーダー層として使用し、そして上記のように得た形質導入CD34+細胞を再播種した。形質導入細胞の一部を培養する別の方法はそれらは胎児牛血清、IL 3 及び幹細胞因子の入った液体培地の中で増殖させることにある。他の部分はメチルセルロースと混合し、そして組織培養皿の中で 10^5 /mlの密度で増殖させた。

2, 7 及び14日後、液体培養液由来の細胞をフローサイトメトリー（フルオリポーター系を利用）により分析し、一方メチルセルロースプレート由来の細胞は個々のコロニーのx-gal 染色及び蛍光フローサイトメトリーにより調べた。蛍光研究において、全ての細

胞をフルオリポーター試薬及び蛍光CD34抗体で染色した。

これらの結果はCD34+細胞の30~100 %がマーカー遺伝子について陽性であったことを示し、陽性細胞の比率はMOI が上昇すると上昇した。14日目には、わずかな細胞及びコロニーが陽性であり（2~50%）、導入遺伝子の発現が一部の細胞において一過性であったことを示す。半固形（メチルセルロース）培養物中でも細胞及び個々のコロニーは陽性であったため、メチルセルロースは蛍光的に陰性であるが、検出されるシグナルが形質導入細胞から非形質導入細胞に至るタンパク質の交換によるのではなく、任意の増殖刺激シグナルの非存在下での正常な造血先祖細胞の非常に効率的な形質導入を示すものである。更なる試験において、高い効率の発現が形質導入の例えば48時間後に得られることが見いだされ、約24~48時間でピークに達成した。

lacZの形質導入及び発現についての上記の方法は、前記の通り lacZの代わりに対応のその他の遺伝子材料を担持する他のウィルスベクターを利用することによりその他の所望のタンパク質及び遺伝子材料に容易に応用できる。

ベクター形質転換されたヒトALL 及びその他の細胞によるGM-CSFの発現：

上記の通りに構築したサイトカイン（GM-CSF）をコードする遺伝子を担持する不能ヘルペスウィルスベクターの例（GM-CSFをコードするgH欠陥HSV ベクター）はヒト急性リンパ球白血病(ALL)、並びにマウスリンパ芽球白血病(MLL)及びヒト神経芽細胞系の形質導入細胞におけるコード化サイトカインの生産を誘導できる

ことを示すデータが得られた。

細胞系を標準の態様で形質導入し、そして形質導入の1, 3及び7日目に、それらを商業的に入手できるイムノアッセイ(Endogen)

によりGM-CSF分泌について試験した。図7は様々なMOI(感染多重度:細胞カウント数当りのウイルスpfuの比)での様々な形質導入細胞系によるGM-CSF分泌についての試験結果を表わすバーチャートである。3本で一組の連続バーそれぞれは表示の条件設定下(細胞タイプ、MOI)での1, 3及び7日目のそれぞれでの生産を示す。縦軸は24時間当りの 5×10^5 細胞当りのGM-CSF生産のスケールを示す。

分泌は少なくとも7日間起ることがわかり、そしてその結果は単に早期に発現されたタンパク質の存続によるものではないようである。それ故、低い感染多重度(例えば約0.05~約1, 5又は10の範囲)でヒト腫瘍細胞に対して有効でありうる。比較のために用いたマウス腫瘍細胞は、ヒト細胞よりも約20倍形質導入されにくかった。

CD34+一次骨髄細胞によるGM-CSFの発現

図8は正常成人起源由来のCD34+一次骨髄細胞(造血先祖細胞)の有効な形質導入の結果を示すFACSプロットである。

サイトカイン(GM-CSF)をコードする遺伝子を担持する不能ヘルペスウイルスベクター(GM-CSFをコードするgH欠失HSVベクター)を利用して骨髄細胞を形質転換した。細胞をCD34選別により標準の態様で精製し、そしてCD34抗原について標準の態様で染色した。同様にして、その他のCD34+細胞、例えば悪性特性を示すものが形質導入できる又はその後使用できる。例えば免疫原治療用ワクチンとして、親細胞が由来している患者に再導入するか、又はin vitro/ex vivo でリンパ球を感作又は刺激するのに利用できる。

【図1】

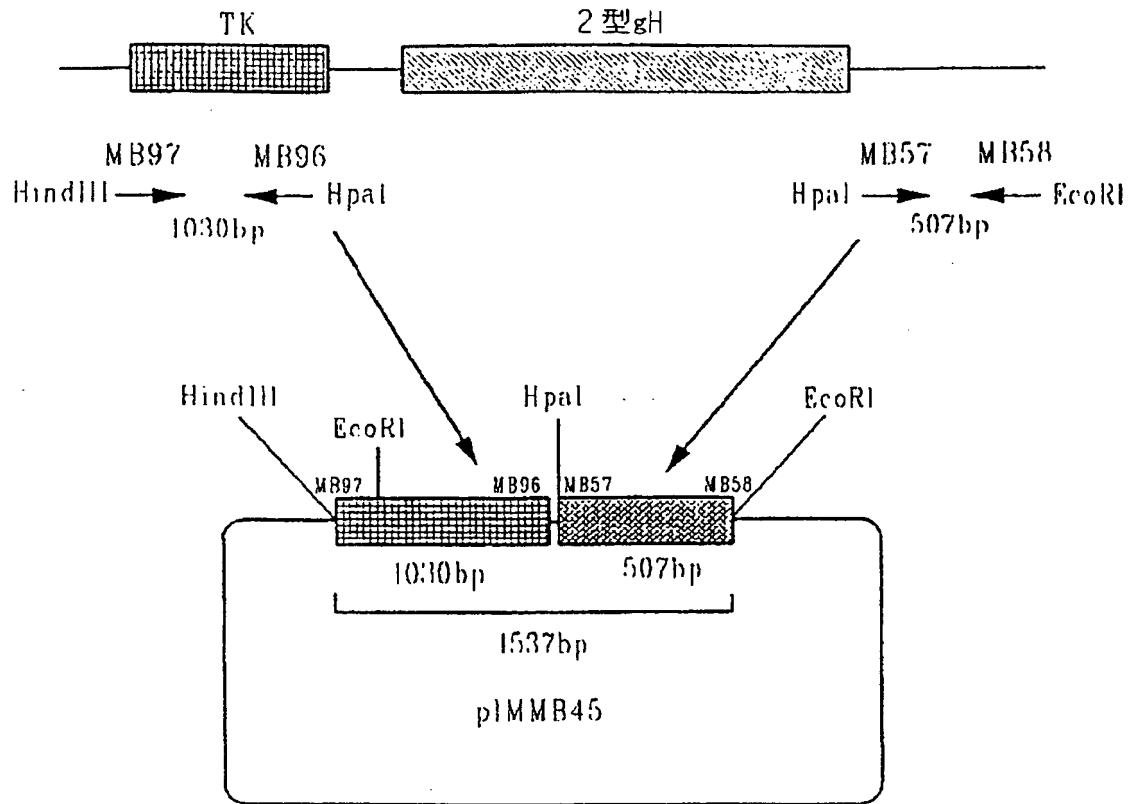


Fig. 1

【図2】

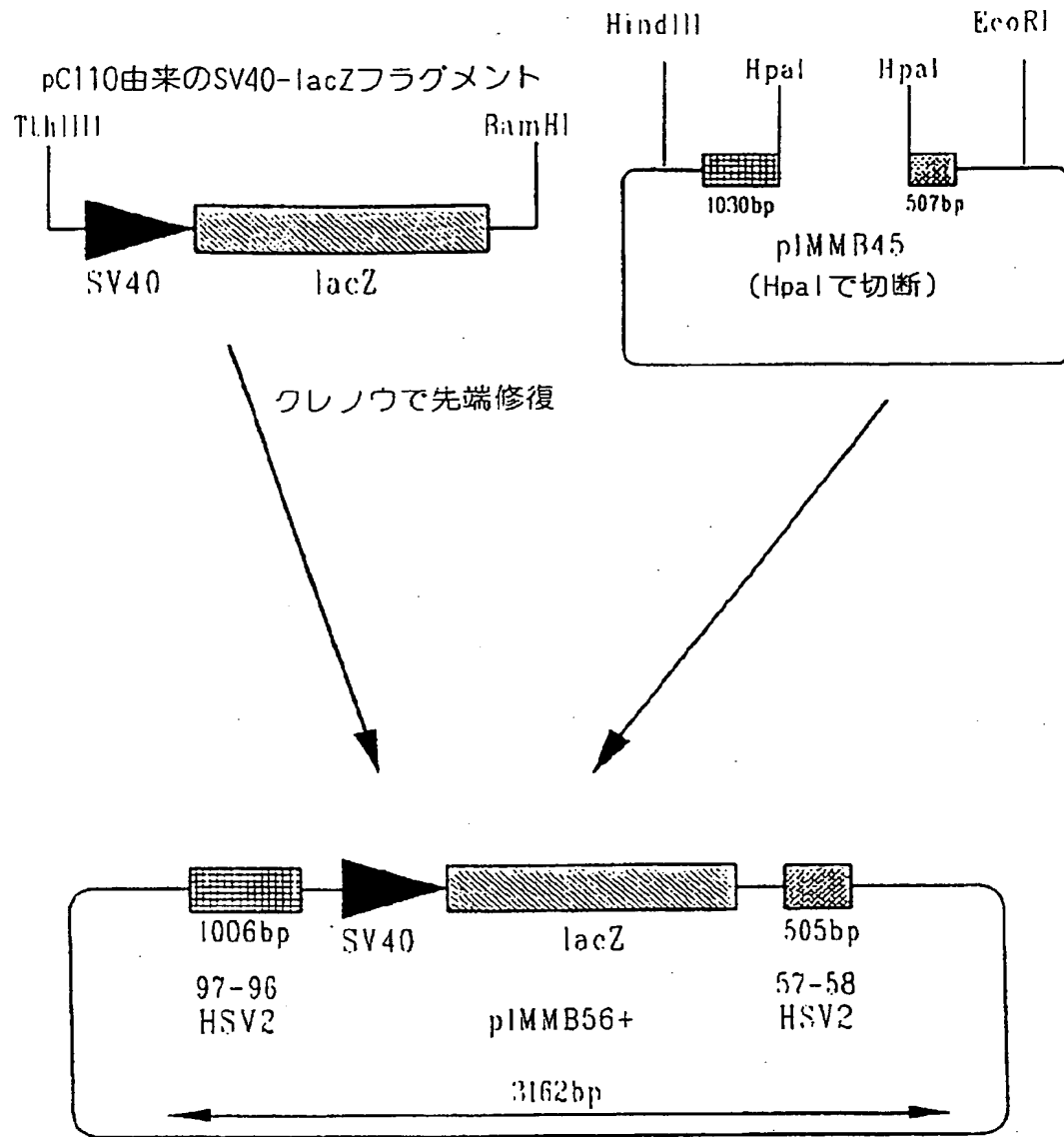
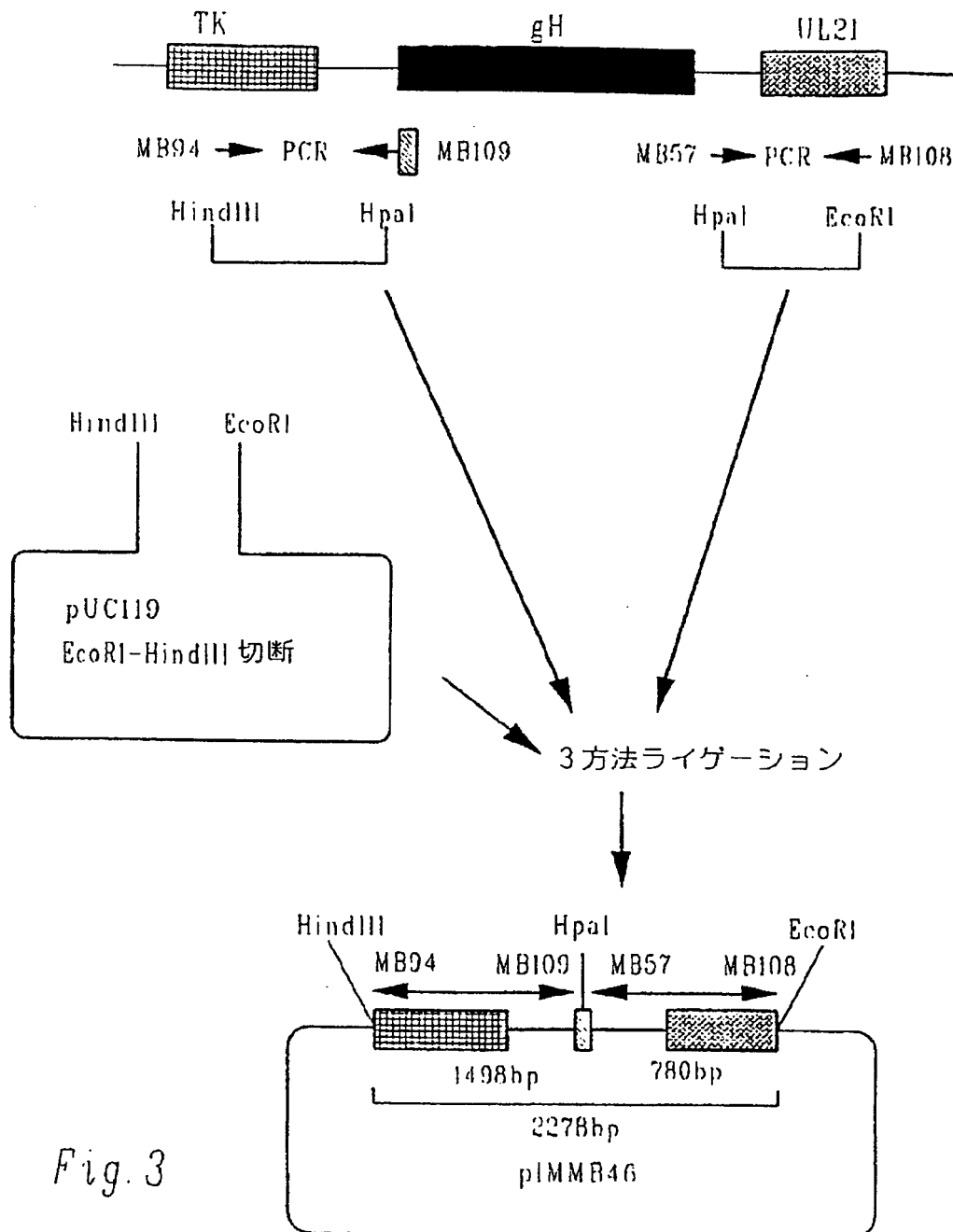


Fig. 2

【図3】



【図4】

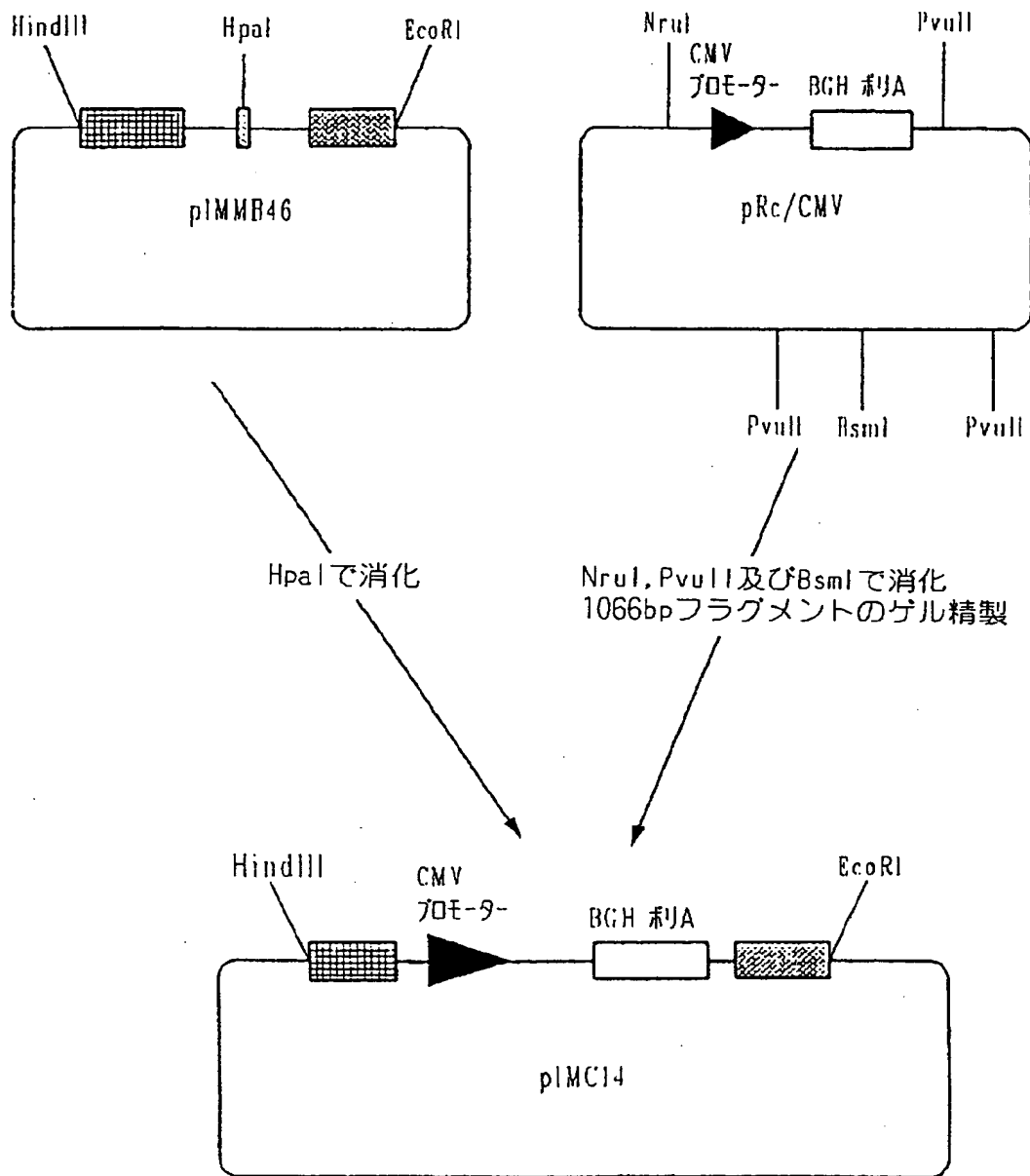


Fig. 4

【図5】

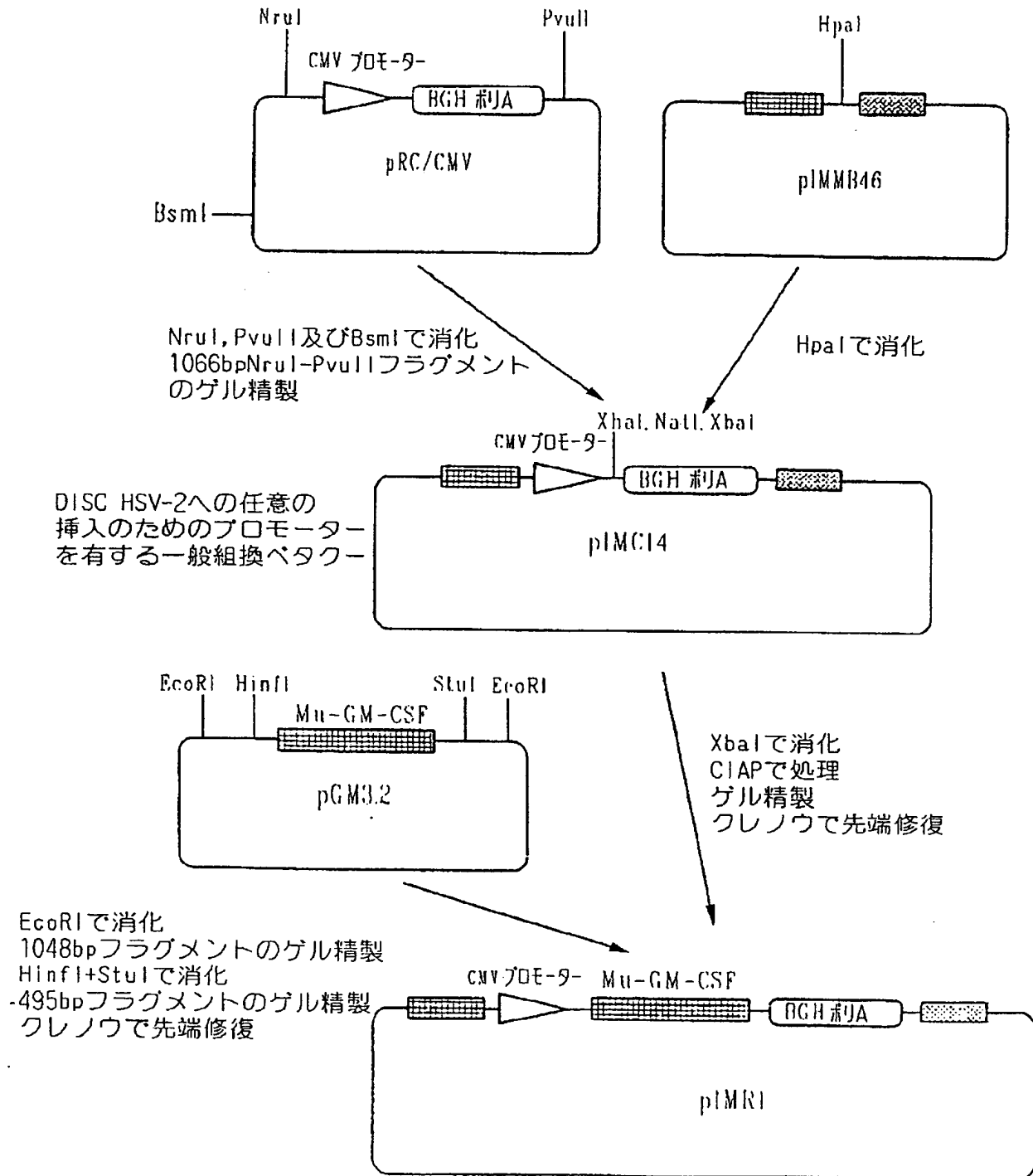


Fig. 5

【図6】

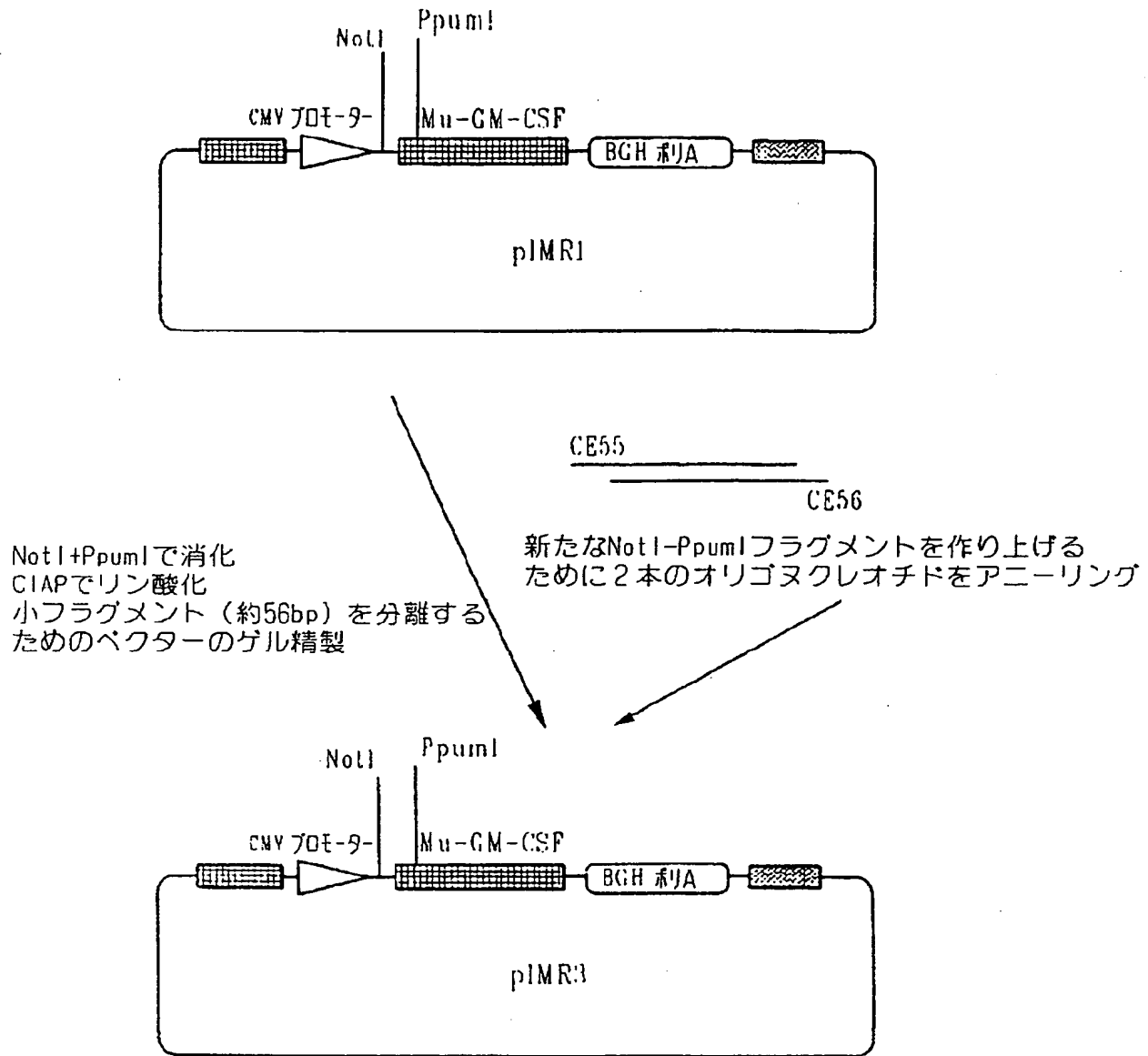
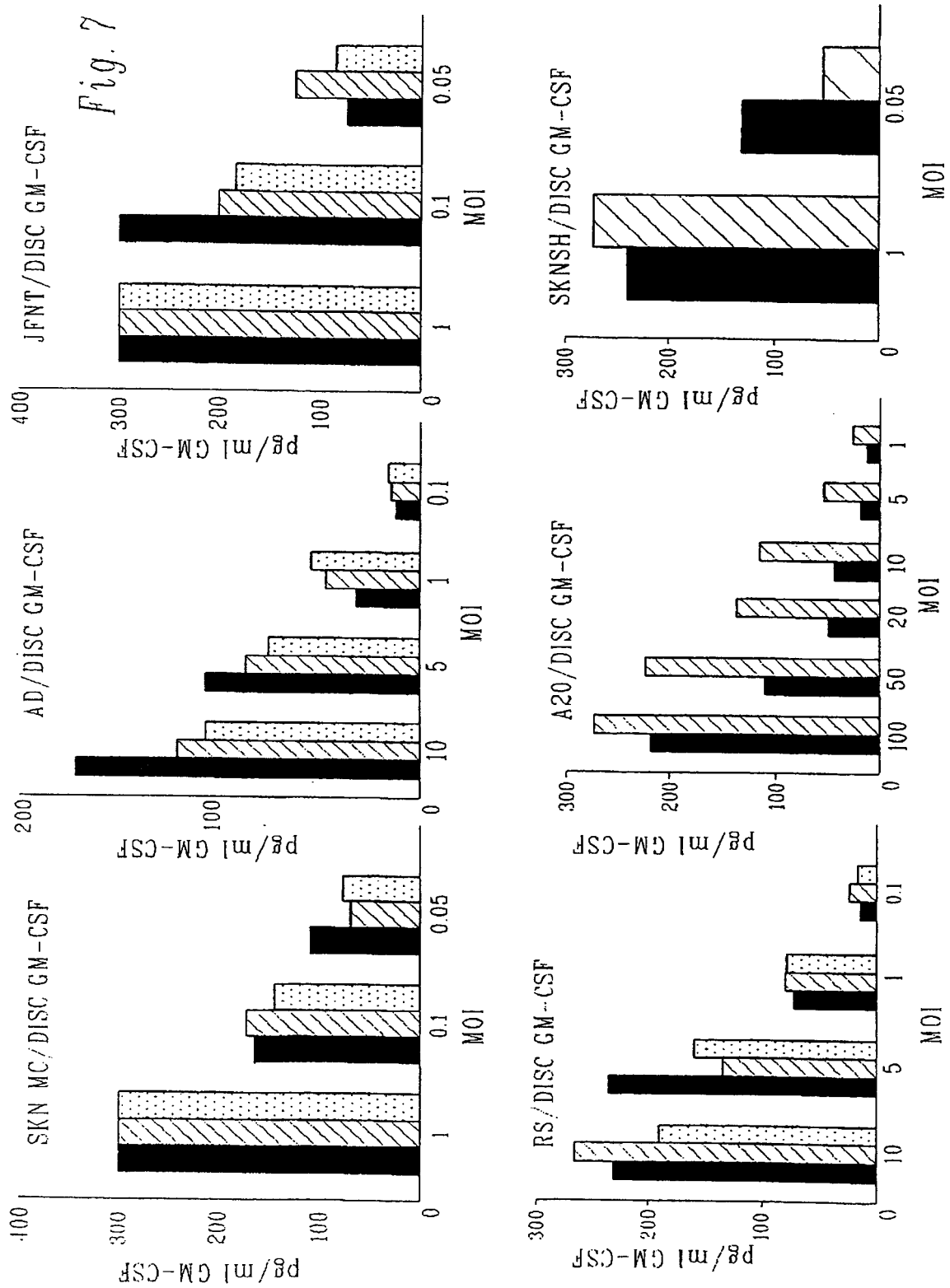


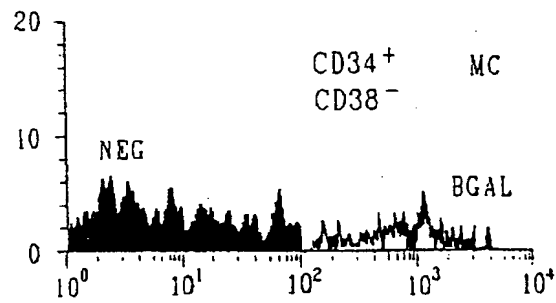
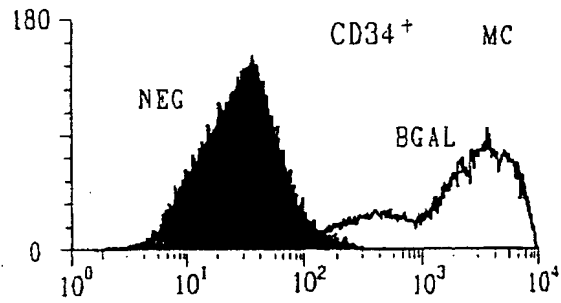
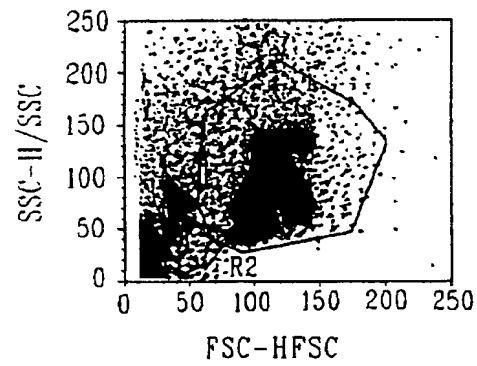
Fig. 6

【図7】



【図8】

Fig. 8

CD34⁺ 骨髓細胞

Day +7

MOI 0.1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 96/02576		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/86 C12N5/16 C12N5/22 A61K48/00				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K C12N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	ADV. EXP. MED. BIOL., vol. 257, 1989, pages 187-192, XP000650651 B. MEIGNIER AND B. ROIZMAN: "Genetic engineering and properties of novel HSV for use as potential vaccines and as vectors of foreign genes" *see the whole article*	1-20		
Y	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, 1995, pages 45-55, XP000650614 S. EFSTATHIOU AND A.C. MINSON: "Herpes virus-based vectors" *see the whole article*	1-20		
-/--				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 9 May 1997		Date of mailing of the international search report 22.05.97		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5814 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Marie, A		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No.

PCT/GB 96/02576

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 18852 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 13 July 1995 *see the whole patent* ---	1-20
Y	ACTA NEUROPATHOL., vol. 88, 1994, pages 454-458, XP002030671 A. CHAUBAL ET AL.: "cd34 IMMUNOREACTIVITY IN NERVOUS SYSTEM TUMORS" *see the whole article* ---	1-20
Y	HISTOPATHOLOGY, vol. 25, 1994, pages 469-473, XP002030672 J.M. MONIHAN ET AL.: "CD34 immunoexpression in stromal tumors of the gastrointestinal tract and in mesenteric fibromatoses" *see the whole article* ---	1-20
Y	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 25, 1995, pages 1508-1516, XP000653027 GUOSHENG LIN ET AL.: "Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues" *see the whole article* ---	1-20
Y	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 65, no. 5, 1991, pages 2761-2765, XP000650705 M. VAN ZIYL ET AL.: "Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera" *see the whole article* ---	1-20
Y	ACTA VIROL., vol. 124, 1992, pages 1-20, XP000650904 S. KIT ET AL.: "Expression of porcine pseudorabies virus genes by a bovine HSV-1 (infectious bovine rhinotracheitis virus) vector" *see the whole article* ---	1-20
Y	GENE THERAPY, vol. 2, 1995, pages 187-196, XP000650871 J.C. MESTER ET AL.: "Antiviral activity of HSV vectors expressing murine alfa1-interferon" *see the whole article* ---	1-20

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 96/02576

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 92 05263 A (IMMUNOLOGY LIMITED) 2 April 1992 *see the whole patent* ---	1-20
Y	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL 0 (17 PART E), 1993, page 220 XP000650593 T. FRIEDMANN ET AL.: "Improved replication-defective HSV-1 vectors" *see the whole abstract* ---	1-20
Y	THE NEW BIOLOGIST, vol. 4, no. 3, 1992, pages 238-246, XP000650666 A. MIYANOHARA ET AL.: "Direct gene transfer to the liver with HSV-1 vectors: transfer production of physiologically relevant levels of circulating factor IX" *see the whole article* ---	1-20
Y	GENE THERAPY, vol. 2, 1995, pages 385-392A, XP000650866 J. HUARD ET AL.: "HSV-1 vector mediated gene transfer to muscle" *see the whole article* ---	1-20
Y	WO 94 21807 A (CANTAB PHARMACEUTICALS RESEARCH LIMITED) 29 September 1994 *see the whole patent* ---	1-20
Y	WO 94 03207 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 17 February 1994 *see the whole patent* ---	1-20
Y	WO 91 02788 A (UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF GLASGOW) 7 March 1991 *see the whole patent* ---	1-20
Y	CIRCULATION RESEARCH, vol. 76, no. 2, 1995, pages 161-167, XP000650645 E.A. MESRI ET AL.: "Expression of VEGF from a defective HSV-1 amplicon vector induces angiogenesis in mice" *see the whole article* -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No.

PCT/GB 96/02576

Parent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9518852 A	13-07-95	CA 2180551 A EP 0739414 A	13-07-95 30-10-96
WO 9205263 A	02-04-92	AU 658836 B AU 8648991 A CA 2091678 A EP 0550553 A GB 2263480 A,B JP 6504194 T OA 9777 A	04-05-95 15-04-92 26-03-92 14-07-93 28-07-93 19-05-94 30-11-93
WO 9421807 A	29-09-94	AU 6261794 A CA 2158148 A EP 0689603 A JP 8507784 T	11-10-94 29-09-94 03-01-96 20-08-96
WO 9403207 A	17-02-94	CA 2141574 A EP 0652772 A JP 8502043 T	17-02-94 17-05-95 05-03-96
WO 9102788 A	07-03-91	AT 132897 T AU 628650 B AU 6276290 A CA 2067330 A DE 69024809 D DE 69024809 T EP 0487611 A ES 2084703 T GB 2234972 A,B	15-01-96 17-09-92 03-04-91 16-02-91 22-02-96 30-05-96 03-06-92 16-05-96 20-02-91

 フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 バースネル, マイケル エドワード グリ
フィス

イギリス国, ケンブリッジ シービー1
4 エヌワイ, ネザホール ウェイ 46

(72)発明者 ブレナー, マルコム キース
アメリカ合衆国, テネシー 38103, メン
フィス, リバーパーク ドライブ 814

(72)発明者 ディロー, ダグマー
アメリカ合衆国, テネシー 38103, メン
フィス, ハーバー クラブ サークル
301 148

(72)発明者 イングリス, スティーブン チャールズ
イギリス国, ケンブリッジ シービー1
6 エルエックス, リントン, ルガーブ ガー
デンズ, 2